

Graduado en Ingeniería Informática

Universidad Politécnica de Madrid
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Informáticos

TRABAJO FIN DE GRADO

**Diseño e implementación de un módulo de
crecimiento bacteriano dependiente de
nutrientes en el simulador GRO**

Autor: Sandra Sáez Raspeño

Director: Alfonso Rodríguez-Patón Aradas

MADRID, JULIO DE 2015

Agradecimientos

A mi abuela, por iluminar mi vida y cuidarme todos estos años, por ser una luchadora hasta el final, pero sobre todo, por enseñarme que en la vida todo se puede conseguir con pasión, esfuerzo y sacrificio.

Todo te lo debo a ti. Te quiero.

Resumen

Hace no más de una década que empezó a escucharse el término **biología sintética**. Este área de estudio emergente consiste en la ingeniería y programación de sistemas biológicos, tratando la biología como una tecnología programable a la que aplican los principios y metodologías de la ingeniería, con el fin de crear nuevas funcionalidades genéticas desde cero, procurando así algún beneficio como por ejemplo, programar células bacterianas para producir biocombustibles. Sin embargo, para la creación de dichas funcionalidades es necesario conocer bien al organismo sobre el que se van a implantar. Por este motivo, los biólogos sintéticos emplean **bacterias** en sus estudios, ya que es la forma de vida más simple, está presente en prácticamente todos los nichos ecológicos, desempeña algunas de las funcionalidades vitales para los humanos y lo más importante, se conoce prácticamente todo su material genético.

Los experimentos son costosos en tiempo y dinero, siendo necesaria la ayuda de herramientas que faciliten esta labor, los **simuladores**. En PLASWIREs, proyecto europeo de biología sintética en el que se engloba este trabajo, el simulador empleado es GRO. Sin embargo, en GRO el crecimiento de las bacterias ocurre de forma exponencial y sin restricciones, generando comportamientos poco realistas. Por ello, se ha considerado relevante en biología sintética, y en el simulador GRO en particular, disponer de un modelo de crecimiento bacteriano dependiente de los nutrientes.

El desarrollo de este trabajo se centra en la implementación de un **módulo de consumo de nutrientes** en colonias de bacterias simuladas con GRO, introduciendo así la limitación de nutrientes y evitando que las bacterias crezcan exponencialmente. Se han introducido nutrientes en el medio y la capacidad de consumirlos, con el objetivo de obtener un crecimiento ajustado al que ocurre en la naturaleza.

Además, se ha desarrollado en GRO una nueva **función de adquisición de volumen**, que condiciona el volumen adquirido por cada bacteria en función de los nutrientes.

La implementación de las dos aportaciones presentadas ha supuesto la adición de funcionalidad extra a GRO, convirtiéndolo en el único simulador de bacterias que tiene en cuenta el crecimiento bacteriano dependiente de nutrientes.

Abstract

It has been in this last decade that the synthetic biology term began to be heard. This emergent area of study consists in the engineering and programming of biological systems, dealing with biology as a programmable technology in which the engineering principles and methodologies are applied in order to create novel genetic functionalities from scratch, obtaining some advantages such as programmed bacteria in order to produce biofuels. However, to create these functionalities, it is necessary to know well the organisms in which they are going to be implemented. For this reason, synthetic biology researchers use bacteria, because it is the simplest life form, it can be found in almost all the ecological niche, it does some vital function to humans and, most important, almost all of its genetic information is known.

Experiments are expensive in time and money, making it necessary to use tools to ease this task: the simulators. In PLASWIREs, the European synthetic biology project in which this work is included, the simulator used is GRO. However, the bacterial growth in GRO is exponential and it does not have restrictions, generating unrealistic behaviours. Therefore, it has been considered relevant in synthetic biology, and in a particular way in GRO, to provide a bacterial growth model dependent on nutrient.

This work focuses on the implementation of a nutrient consumption module in bacteria colonies simulated with GRO, introducing a nutrient limitation and avoiding the bacteria exponential growth. The module introduces nutrients and the capacity for bacteria to consume them, aiming to obtain realistic growth simulations that fit the observations made in nature.

Moreover, an acquisition volume function has been developed in GRO, determining the volume depending on nutrients.

These two contributions make GRO the only bacteria simulator that computes growth depending on nutrients.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Objetivos de este trabajo	2
1.2. Organización del contenido	4
 I. FUNDAMENTOS	 5
2. Estado del arte	6
2.1. Simuladores fundamentados en Modelos basados en Individuos	7
2.1.1. BactoSim	8
2.1.2. CellModeler4	8
2.1.3. DiSCUS	9
2.1.4. GRO	9
2.1.5. iDynamics	10
 3. Introducción a la Microbiología	 11
3.1. Filogenia	11
3.2. Características estructurales de las bacterias	12
3.2.1. Tamaño y forma	14
3.2.2. Escherichia coli	15
3.3. Transporte de nutrientes	15
3.4. Medios de cultivo	16
3.5. Biofilms de bacterias	17
3.6. Crecimiento	18
3.6.1. Fases del crecimiento	19
3.6.2. Técnicas de cultivo	20
 4. Arquitectura del sistema	 22
4.1. GRO	22
4.2. Ciclo de ejecución de GRO	23

II. DESARROLLO Y APORTACIONES	27
5. Módulo de consumo de nutrientes	28
5.1. Submódulo principal: cellsignal.c	30
5.2. Submódulo de mallado: grid.c	32
5.3. Submódulo de consumo: nutrient.c	34
6. Cinética de crecimiento	35
6.1. Ecuación de Monod	36
III. RESULTADOS	39
7. Simulaciones y resultados	40
7.1. Estudio de los parámetros	40
7.1.1. Parámetros de la curva de crecimiento	40
7.1.2. Parámetros del módulo de consumo de nutrientes	43
7.1.2.1. Concentración máxima de nutrientes	44
7.1.2.2. Tasa de adquisición y variabilidad de la misma	44
7.1.2.3. Número de celdas y tamaño de cada una	45
7.1.2.4. Modo de asignación de concentración	47
7.2. Obtención de la fase estacionaria	48
7.2.1. Curva sigmoideal	49
7.2.2. Convergencia al mismo tamaño final	50
7.2.3. Convergencia a distintos tamaños finales	52
7.3. Difusión de los nutrientes	53
7.3.1. Difusión a distancia 1	54
7.3.2. Difusión a distancia 2	58
7.3.3. Difusión con reducción de nutrientes	62
8. Conclusiones	64
9. Trabajo futuro	66

Capítulo 1

Introducción

En los últimos años se ha empezado a escuchar el término **biología sintética** en casi todos los espacios científicos como revistas y conferencias. Pertenecce a un área de investigación joven, que surge de la necesidad de dar un paso más allá de la ingeniería genética clásica. Es un campo que está evolucionando a gran velocidad y quizás, por ello, hay varias definiciones posibles. Común a muchas explicaciones es la idea de que la biología sintética consiste en la aplicación de los principios de la ingeniería a los componentes fundamentales de la biología.

Todos los seres vivos contienen un conjunto de instrucciones, los genes, que determinan cómo van a ser y qué van a hacer. Dichas instrucciones se encuentran codificadas en el ADN (ácido desoxirribonucleico), una gran cadena de moléculas contenida en cada célula viva formando lo que se conoce por el nombre de genoma. Como se mencionaba, las unidades en las que se encapsula la información vital son los genes aunque su posesión no implica la expresión de su funcionalidad. Para que un gen se exprese, es decir, realice la función para la cual está programado biológicamente (natural o sintética), es necesario que un determinado tipo de moléculas, conocidas como factores de transcripción, activen o repriman la expresión de ese gen. Al conjunto formado por los genes y sus moléculas promotoras y/o represoras se le denomina operón. La interrelación entre muchos de estos operones forma una red genética, término básico en la biología sintética e inspirado en los circuitos electrónicos en los que se realizan operaciones booleanas para permitir o no que pase la corriente eléctrica.

A diferencia de la ingeniería genética, cuyo objetivo es modificar las instrucciones conocidas de los seres vivos, la biología sintética plantea varias alternativas relacionadas con la idea de crear vida a partir de vida, estudiando a fondo las piezas fundamentales que la componen y sus propiedades para combinarlas de distinta forma creando distintos circuitos genéticos. Por un lado, se plantea el diseño y fabricación tanto de componentes como de sistemas biológicos que no existen en la naturaleza. Un ejemplo, podría ser la creación de bacterias que se adhieren a células

cancerígenas, lo cual permite detectar la zona en la que se encuentra el tumor. Y por otro lado, el rediseño de organismos existentes, lo que implica el uso de moléculas naturales y su incorporación de nuevo en el organismo pero con algún cambio realizado, de forma que éste no actúe como lo haría naturalmente. Esta alternativa está siendo bastante explotada, por ejemplo, para la generación de biocombustibles o la estimulación de la fotosíntesis en plantas para que generen más energía.

Evidentemente, a pesar de la velocidad con la que emergen nuevos descubrimientos sobre genética y biología molecular, el estado de desarrollo en el que nos encontramos hoy en día no hubiera sido posible si la ingeniería no hubiese avanzado al mismo tiempo, en especial la computación.

La realización de experimentos *in vivo* es lenta, costosa tanto en tiempo como en dinero y con un alto grado de complejidad. Por este motivo, la computación juega un papel crucial ya que permite modelar y simular el comportamiento genético de un organismo de forma precisa. Los ingenieros tratan el ADN como si fuera un lenguaje de programación, sustituyendo los ceros y unos por las moléculas que lo forman (adenina, citosina, guanina y timina). El principal objetivo desde el punto de vista computacional es crear desde cero pequeños fragmentos de ADN que no existan en la naturaleza y ejecutar este código genético en una célula en lugar de un ordenador. La mayor diferencia con el software creado hasta el momento es que éste es capaz de construir su propio hardware gracias a la replicación celular pasando de tener una copia del código programado a cientos en cuestión de horas.

1.1. Objetivos de este trabajo

En esta sección se presenta, con el objetivo de mostrar la meta que se persigue en este trabajo, una perspectiva general sobre la necesidad de modelar y simular en el desarrollo de la biología sintética.

Tras la fase de diseño de un circuito genético sintético, en el que se propone una nueva funcionalidad o modificación de una ya existente, es necesario comprobar si es correcto y funciona según lo esperado. Anteriormente a la biología sintética, esta labor de validación se realizaba *in vivo* con los costes que ello supone. Se perdía mucho tiempo en comprobar los resultados de un experimento, por no mencionar que la mayoría de los intentos son fallidos, además de los costes de material, tanto biológico como de instrumental. Sin embargo, tras la inclusión de la ingeniería se crearon potentes herramientas para ayudar en la tarea de prevalidación y prototipado: los simuladores. Aunque la utilización de los mismos no evita el tener que seguir validando posteriormente *in vivo*.

El objetivo perseguido por los simuladores consiste en representar de forma precisa y realista el comportamiento del sistema bajo estudio. No obstante, los simuladores se

rigen por las directrices de los modelos dados, por lo que el correcto diseño del modelo es muy importante si se quieren obtener los resultados esperados. Cuanto más se ajuste el modelo al comportamiento real del sistema que queremos representar, más realistas y mejores resultados obtendremos. Sin embargo, el desarrollo del modelo no es algo fijo que deba hacerse desde el principio sino que supone una tarea de refinamiento en la que hay que pulirlo poco a poco según los resultados obtenidos en las simulaciones realizadas.

La posibilidad de predecir el comportamiento que seguirá un circuito genético en su medio natural es prácticamente imposible debido a las distorsiones producidas, como alteraciones en el medio. Sin embargo, en las simulaciones se debe reflejar un control de este tipo de distorsiones como resultado de un buen diseño del modelo en el que se contemplan las mismas.

La mayoría de los simuladores empleados en biología sintética han sido diseñados para estudiar en detalle el comportamiento y procesos intracelulares. El diseño de nuevos circuitos genéticos se realiza a escala intracelular ya que todos los componentes genéticos se encuentran en el interior de la célula. Sin embargo, la funcionalidad de dichos circuitos está limitada precisamente por la escala desde la que es abordado el problema. Por esta razón, es necesario empezar a considerar la adopción de una escala a nivel multicelular, en la que se tienen en cuenta las interacciones entre células.

En dicha aproximación, cada célula forma una unidad independiente de procesamiento que desempeña una tarea específica que puede verse alterada por la comunicación, tanto con otras células como con el medio en el que se encuentra. Este enfoque está comenzando a tener éxito en los últimos años, en primer lugar debido a la necesidad de obtener simulaciones más parecidas a la realidad; y en segundo lugar, debido a la mejora en potencia de cómputo, ya que estamos hablando de simulaciones grandes en las que se computan distribuidamente los procesos desempeñados por millones de células. Además, hay que remarcar que el sistema debe ser escalable ya que el número de individuos crece conforme avanza el tiempo de simulación.

En biología sintética, las células son tratadas como procesadores que operan por separado, de forma que un conjunto de células constituiría un super-computador paralelo cuyo número de procesadores se duplica cada 30-50 minutos, debido al proceso de división continua propio de las células.

El marco teórico de trabajo se focaliza en las simulaciones obtenidas a nivel multicelular con bacterias, además de restricciones en el medio, más concretamente con restricción de nutrientes. Actualmente, dentro del proyecto europeo en el que se desempeña el trabajo, PLASWIRES¹, el simulador multicelular empleado es GRO. Por el momento, GRO no ofrece una restricción en la cantidad de nutrientes dis-

¹www.plaswires.eu

ponibles en el medio, suponiendo una cantidad infinita, lo que resulta en simulaciones alejadas de comportamientos interesantes desde el punto de vista científico. Dicha carencia de nutrientes produce un incremento exponencial en el número de células ya que al no haber un límite se replican sin restricción alguna. Por este motivo, se plantea la implementación de dicha restricción en el medio tras lo cual se obtendrán simulaciones considerablemente más realistas y de gran valor para los estudios científicos relacionados.

1.2. Organización del contenido

El contenido del trabajo se encuentra organizado en cuatro partes principales.

En la primera se encuentra el capítulo introductorio en el que se explica desde una perspectiva general el marco científico en el que sitúa el trabajo, con el objetivo de mostrar al lector cuales son las diferentes áreas de conocimiento involucradas.

En la segunda parte se presenta todo el marco teórico, a través de tres capítulos, necesario para la adecuada comprensión del trabajo. En primer lugar, se desarrolla el estado del arte con el fin de esbozar de una perspectiva general los simuladores empleados en biología sintética hoy en día. En segundo lugar, se explican los fundamentos biológicos que subyacen al desarrollo del proyecto, necesarios para entender el alcance del mismo. En el se explican al lector los organismos sobre los que se llevan a cabo las simulaciones, las bacterias *E. coli*, así como sus mecanismos biológicos relacionados con la adquisición de nutrientes. Para finalizar la parte teórica, se introduce la arquitectura del simulador GRO, presentando la arquitectura resultante tras la adición de las aportaciones realizadas en este trabajo.

A continuación, se dedicarán dos capítulos a presentar las aportaciones implementadas en este trabajo. Primeramente, se hablará del módulo de consumo de nutrientes implementado, encargado de condicionar el crecimiento debido a la necesaria consumición de nutrientes. Posteriormente, se tratará la ecuación de crecimiento implementada en el simulador GRO.

Para acabar, en la última parte, se muestran las simulaciones obtenidas llevando a cabo un estudio exhaustivo de los parámetros influyentes, así como una discusión de los resultados obtenidos. Además, se presentarán tanto las líneas de trabajo futuras como las conclusiones alcanzadas.

Parte I.

FUNDAMENTOS

Capítulo 2

Estado del arte

La utilización de simuladores en biología sintética es esencial ya que permite llevar a cabo multitud de experimentos permitiendo reducir los costes, tanto en tiempo como en dinero.

El objetivo que se persigue mediante la utilización de simuladores es la obtención de representaciones basadas en comportamientos reales de una forma precisa. Ahora bien, los comportamientos deseados se rigen por unos modelos dados, que gracias a la actuación del simulador se podrá verificar si se ajustan correctamente. Cuánto más ajustado y preciso sea el modelo más realista será el comportamiento obtenido en las simulaciones.

Una dificultad añadida, como consecuencia de la simulación de bacterias, es la imposibilidad de predecir el comportamiento en la naturaleza de las mismas debido a posibles distorsiones en el medio u otro tipo de inconvenientes. Por este motivo, desde el comienzo de la fase de diseño del modelo es necesario controlar los parámetros que pueden introducir distorsiones para o bien evitarlos o bien minimizarlos, aunque en ocasiones podamos utilizarlas para la construcción del modelo.

La gran mayoría de simuladores empleados en biología sintética se centran en el diseño de modelos orientados al estudio detallado de los procesos que se llevan a cabo intracelularmente. El por qué de este enfoque se debe a que los componentes genéticos, responsables de dichos procesos, se encuentran en el interior celular. Sin embargo, los modelos creados según este planteamiento presentan dificultades a la hora de estudiar comportamientos colectivos en los que se tienen en cuenta las interacciones entre células.

Los sistemas simulados son de gran complejidad, en especial en el caso multicelular en el que hay un gran número de individuos con un comportamiento sometido a continuas variaciones, como sucedería en el medio natural. Respecto a la búsqueda del modelo que mejor se ciña al sistema que se desea simular hay que destacar dos

tipos: Modelos Basados en Ecuaciones Diferenciales (**DEs**) y Modelos basados en Individuos (**IbM**, también conocidos como Modelos basados en Agentes o **AbM**).

En lo que respecta a los modelos basados en ecuaciones diferenciales, permiten capturar las características por medio de la identificación de ecuaciones, así como de las variables que las conforman, que describan el comportamiento del sistema que se desea simular. Este tipo de modelos son muy empleados cuando se desean estudiar procesos a nivel intracelular ya que permiten hacer un análisis de cada individuo con un alto grado de detalle. En contraposición, cuando se trata de analizar comportamientos colectivos, no es el tipo de modelo más adecuado ya que no se ajusta correctamente al nivel de detalle esperado al aumentar la escala.

Para resolver las limitaciones de ajuste a gran escala presentes en los DEs surgen los Modelos basados en Individuos. El por qué suponen una mejora en situaciones con un gran número de individuos, está relacionado con el hecho de que incorporan relaciones espaciales al modelo, dando cada individuo una posición en el espacio, además de simplificar la construcción del mismo. De esta forma, se representa a cada individuo como una entidad con comportamiento propio pero que, a su vez, se relaciona tanto con el resto de individuos como con el medio. Otra característica fundamental de los IbMs y por ende su amplia utilización en biología sintética, es que como fruto de las interacciones emerge un comportamiento colectivo a partir de los comportamientos individuales.

El funcionamiento de los IbMs se rige por el establecimiento de una serie de reglas y parámetros globales que se aplicarán a cada individuo en cada paso de la simulación. En general, las reglas suelen seguir expresándose a modo de ecuación diferencial pero teniendo en cuenta la interacción con otros individuos y el medio, lo cual lo hace diferente a los DEs.

Por los motivos expuestos, la herramienta software empleada en el proyecto PLAS-WIRES, en el que se engloba este trabajo, es un IbM. Gracias a esta decisión, se pueden estudiar las características de grandes colonias de bacterias considerando cada una como un individuo, además de permitir analizar el comportamiento que surge a nivel colectivo de la interacción de los mismos.

2.1. Simuladores fundamentados en Modelos basados en Individuos

Como se mencionaba, los modelos basados en agentes permiten tener en cuenta el comportamiento de cada individuo presente en el sistema, el cual es una entidad independiente. Además, permiten estudiar los comportamientos colectivos que emergen de todos los comportamientos individuales. De esta forma, se permite una simula-

ción del comportamiento de las bacterias de forma más precisa ya que como se verá mas adelante (Sec. 3.5), suele agruparse formando grandes colonias de individuos.

Hay muchos simuladores que implementan modelos basados en agentes, pero los principales son: **BactoSim**, **CellModeler**, **DiSCUS**, **GRO** e **iDynamics**. Todos ellos han sido desarrollados con el mismo propósito, describir y representar el comportamiento de bacterias, pero presentan diferencias en características como el ámbito de la simulaciones, los niveles de abstracción permitidos o cómo de sencillos son de ampliar.

2.1.1. BactoSim

BactoSim es un simulador implementado en Java y como ampliación al sistema multiagente REPAST. Permite modelar comportamientos entre bacterias esféricas de una colonia en los que se tienen en cuenta las relaciones espaciales [1]. El espacio se define como una malla discreta en la que se sitúan los individuos, los cuales interactuarán entre sí. Además, cuenta con un gran número de funcionalidades en los que respecta al crecimiento de la colonia así como a las distintas interacciones que pudieran darse.

Los resultados de las simulaciones se observan en una interfaz gráfica, desarrollada también en Java. Además, tanto la interfaz como los parámetros empleados en las simulaciones, pueden modificarse de forma sencilla por medio de archivos XML.

El hecho de usar Java aporta ventajas como permitir especializar a los individuos gracias a la creación de clases y subclases. Sin embargo, debido a esta misma razón, y como consecuencia del paradigma de programación orientada a objetos, no es fácil de ampliar por personas con pocos conocimientos de programación.

2.1.2. CellModeler4

CellModeler4 es una herramienta de simulación basada en Python y desarrollada como fruto de una colaboración entre la Universidad de Cambridge (UK) y Microsoft Research [2]. Permite la simulación tanto en 2D como en 3D de características como procesos intracelulares, señales moleculares, crecimiento bacteriano y morfología de una colonia.

En esta herramienta, los comportamientos deseados en cada individuo deben implementarse por medio de ecuaciones diferenciales y/o una serie de reglas expresadas en el lenguaje de programación Python. De entre la librerías de Python que se han empleado para su construcción destacan *pyopencl*, *numpy* y *scipy*. Además, una característica importante de esta herramienta frente a las demás mencionadas en

este capítulo es que permite computar paralelamente las simulaciones, permitiendo obtener colonias de gran tamaño en menos tiempo.

Para el paralelismo, la herramienta empleada es OpenCL que permite ejecutar simulaciones tanto en arquitecturas CPU como GPU.

2.1.3. DiSCUS

DiCUS (Discrete Simulation of Conjugation Using Springs) es una herramienta desarrollada por Angel Goñi y Martyn Amos [3] en Python, con el fin de simular colonias de bacterias que interactúen entre sí mediante conjugación. En él las células se representan en forma de bacilo con una longitud y radio dados. Las interacciones físicas entre cada individuo se resuelven teniendo en cuenta parámetros como la forma de las células, su radio o la presión ejercida entre ellas.

Son varios los niveles de abstracción permitidos en la implementación de los modelos, los cuales pueden estar expresados como un conjunto de ecuaciones que lo describan o, a más alto nivel, empleando las funcionalidades proporcionadas por Python.

Una de las ventajas de estar desarrollado en Python es que puede permitir una extensibilidad de la funcionalidad de forma fácil.

2.1.4. GRO

GRO es un *framework* creado por Eric Klavins [4] e implementado en C++, mientras que para la visualización de las simulaciones se usa Qt. Con él se pretenden extender las simulaciones de colonias de bacterias, habitualmente centradas en un solo individuo y con interacciones físicas poco ajustadas a la realidad.

Entre la funcionalidad ofrecida se encuentra el crecimiento bacteriano, la difusión de señales moleculares que permitan transmitir mensajes a lo largo de la colonia e interacciones físicas robustas. A pesar de que el lenguaje se emplea mayormente para simulaciones de bacterias, los individuos del IbM que usa el lenguaje pueden corresponder a cualquier tipo de célula.

Una característica representativa es la expresión de las reglas que dirigirán el comportamiento de la célula bajo estudio por medio de *guardas*. Dichas *guardas* consisten en sentencias con la forma *<guarda:comando>*, en las cuales *guarda* es una expresión booleana y *comando* una lista de acciones. De esta forma, cuando se cumple la *guarda* se ejecutan las acciones encapsuladas en *comando*. Estas sentencias son muy útiles cuando se necesita representar procesos que ocurren a nivel intracelular como la producción o degradación de una sustancia bajo una serie de condiciones.

En GRO se puede implementar a varios niveles de abstracción, permitiendo obtener más nivel de detalle gracias a las *guardas* ya que en ellas se encapsulan las ecuaciones diferenciales que describan los procesos internos.

El entorno físico en el que se ejecutan las simulaciones corresponde a una malla en 2D, al igual que ocurre en DiSCUS (Sec. 2.1.3). Dicho entorno físico está implementado en el motor físico Chipmunk [5]. Sin embargo, en lo que respecta a simulaciones grandes este motor físico supone una carga computacional considerable.

GRO ha sido escogido como lenguaje para el proyecto en el que se engloba este trabajo. Sin embargo, han sido necesarias algunas modificaciones sobre el mismo, como la construcción de un nuevo motor físico, que se detallarán más adelante (Cap. 4).

2.1.5. iDynamics

iDynamics (individual-based Dynamics of Microbial Communities Simulator) es un simulador, también desarrollado en Java, que permite representar modelos tanto en 2D como 3D [6]. Además, permite una gran flexibilidad a la hora de configurarlo permitiendo establecer una gran cantidad de parámetros que contribuyen a obtener resultados más realistas.

Sin embargo, cuenta con una característica que le hace único: simular la presencia de sustancias poliméricas extracelulares. Dicha sustancia hace posible la formación de colonias de bacterias manteniendo unidas las bacterias entre sí. Por tanto, esta característica en los estudios llevados a cabo en biología sintética aporta un gran valor.

Al igual que ocurría en BactoSim (Sec. 2.1.1), al estar desarrollado en Java, se obtienen algunas ventajas como la especialización mediante clases de los agentes o la modularidad permitida por el lenguaje. En cambio, algunas de estas ventajas se convierten en desventajas para usuarios no expertos que deseen ampliar la funcionalidad ofrecida por la herramienta.

A diferencia de las otras herramientas vistas, ofrece la posibilidad de importar y exportar los resultados a XML.

Capítulo 3

Introducción a la Microbiología

Los organismos unicelulares son, en cantidad de individuos, la forma de vida más abundante del planeta, estando presentes en todos los nichos ecológicos. De entre todos estos organismos, las **bacterias** son las más estudiadas, siendo especialmente relevantes en salud, alimentación y multitud de procesos industriales.

A lo largo de este capítulo se presenta a las bacterias como los organismos protagonistas en los laboratorios de biología sintética, explicando desde sus orígenes, pasando tanto por su estructura como por los mecanismos internos de cada una de ellas, hasta culminar en la formación de complejas estructuras, las **colonias de bacterias**.

3.1. Filogenia

La base fundamental de clasificación de todas las cosas vivas es la ausencia o no de núcleo en las células que conforman un organismo. Aquellos organismos que disponen de células con núcleo son llamados **eucariotas**, mientras que aquellos cuyas células no lo tienen son **procariotas**.

De todos los organismos conocidos, las bacterias presentan la estructura más simple ya que no contienen ni orgánulos delimitados por una membrana ni un núcleo que separe el ADN del citoplasma. En ocasiones, los términos “procariota” y “bacteria” son intercambiables.

El árbol filogenético de la vida (Fig. 3.1) está constituido por tres dominios: **Bacteria**, **Archaea** y **Eukarya**. Tradicionalmente se ha considerado a los organismos procariotas como los precursores de los eucariotas, aunque tras la separación del reino de las Archaeas, anteriormente considerados procariotas, se encontró una mayor cercanía entre éste y el reino Eukarya.

En un comienzo, bacterias y archaeas formaban parte de un mismo dominio, pe-

Árbol Filogenético de la Vida

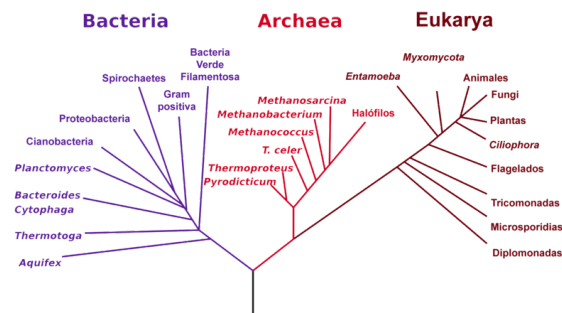


Figura 3.1.: Árbol filogenético de la Vida

ro tras el estudio a nivel molecular de los segundos se decidió separarlos ya que se observó incluso un mayor número de diferencias entre estos que con los eucariotas.

Las archaeas constituyen una forma de vida sorprendente, pudiendo vivir en entornos altamente hostiles como en lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales o bajo la superficie helada de la Antártida.

Por otra parte, la mayoría de las bacterias viven como organismos unicelulares aunque suelen agruparse formando estructuras multicelulares. Mientras que en forma y estructura son limitadas, en términos químicos son los organismos más diversos. Se pueden encontrar en multitud de habitats pero rara vez en entornos tan hostiles como en los que se encuentran las archaeas.

3.2. Características estructurales de las bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas presentes en casi todos los nichos ecológicos, siendo aproximadamente 5×10^{30} en todo el mundo. Debido a su pertenencia al reino Bacteria, no disponen ni de un núcleo que sirva de separación entre el citoplasma y el material genético ni de orgánulos membranosos presentes en otro tipo de células.

Los diferentes componentes observables que constituyen las bacterias (Fig. 3.2) pueden categorizarse en dos grupos [7], **permanentes** y **variables**, según sean constantes en la célula o no. Dentro de los primeros destacan: la **pared celular**, la **membrana celular**, los **ribosomas**, los **cuerpos de inclusión** y el **material genético**. Por otro lado, las estructuras variables son: los **flagelos**, las **fimbrias** o **pilis**, la **cápsula** y los **esporos**.

Otra posible clasificación podría realizarse atendiendo a su localización fuera o dentro de la célula. Los grupos acorde a esta clasificación serían estructuras **internas**

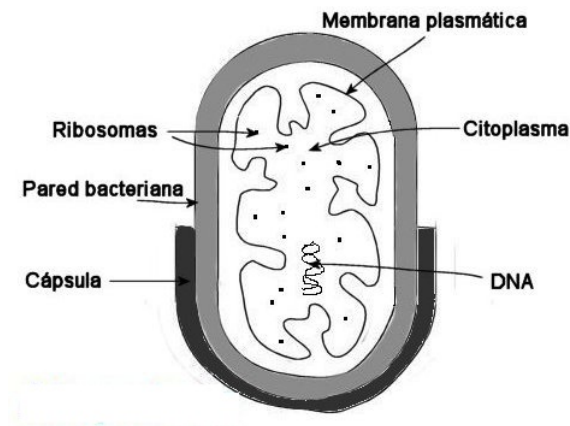


Figura 3.2.: Componentes de la bacteria

o **citoplasmáticas** y estructuras **externas** o de **envoltura celular**. Dentro de las primeras encontramos el material genético, los ribosomas y los cuerpos de inclusión, mientras que el segundo grupo estarían la membrana plasmática, la pared celular, la cápsula y apéndices como fimbrias o pilis y flagelos.

Atendiendo a la segunda clasificación, en el interior celular nos encontramos con las partes básicas que contribuyen al funcionamiento celular. Dentro se encuentra un cromosoma que contiene el material genético localizado en una zona más densa del citoplasma conocida como **nucleoide**. Además, las bacterias como mecanismo de adaptación y resistencia al medio cuentan con la presencia de material genético extracromosómico, los **plásmidos**, que le otorga ventajas evolutivas frente al medio, como la resistencia a antibióticos.

Aparte de la información genética, en el interior celular se encuentran una serie de orgánulos vitales, los ribosomas, que permiten la síntesis de **proteínas**, unas macromoléculas que intervienen en el funcionamiento químico y estructural de la célula. Por otra parte los cuerpos de inclusión o **vacuolas**, desempeñan únicamente una función de reservorio de fluidos o compuestos energéticos que serán usados posteriormente como fuente de energía.

En lo que respecta al exterior celular hay varias capas que lo conforman, siendo una de ellas, la membrana celular, una estructura vital para la bacteria. Dicha membrana supone la separación entre el interior y el exterior celular, por ello, realiza las funciones de barrera osmótica permitiendo la entrada de nutrientes y la salida de los desechos. También, gracias a unas moléculas receptoras presentes en la membrana, las bacterias son capaces de detectar y responder a sustancias químicas del medio externo permitiéndola defenderse en caso de ser nocivas.

Otra estructura externa, vital para las bacterias que disponen de ella, es la pared celular. Su función principal es aumentar las defensas de la misma ante posibles

ataques de antibióticos u otros organismos patógenos. La pared celular es responsable de un esquema ampliamente usando para clasificar a las bacterias. Dicha clasificación se realiza en función de la respuesta a la **tinción Gram**. De esta forma, se obtienen dos clases o grupos: **Grampositivas**, que se tiñen de color azul violeta, y bacterias **Gramnegativas** que adquieren un color rojo. Esta clasificación, más allá de ser la respuesta a un simple tinte, supuso el descubrimiento de las diferencias estructurales en la pared. Las primeras, Grampositivas, contienen una pared gruesa (entre 20 y 80 nm de grosor), mientras que en las Gramnegativas es considerablemente más fina (entre 2 y 7 nm de grosor).

En el exterior, pero sin ser vitales, nos encontramos con otras estructuras como la cápsula y algunos apéndices. La cápsula, por su parte, está ubicada fuera de la pared celular y es generada por la propia bacteria. Como se mencionaba, no es vital su posesión, pero si afecta a la morfología de la colonia (Sec. 3.5) en la cual se encuentra la bacteria.

En lo que respecta a los apéndices, su función son principalmente las de otorgar movilidad, adherencia e intercambio de material genético.

3.2.1. Tamaño y forma

Cada raza o cepa de bacterias presenta diversidad tanto en tamaño como en forma. Estos “parámetros”, aunque vienen determinados en la información genética de cada cepa, están altamente influidos por una serie de condiciones ambientales, como los nutrientes o la temperatura, que condicionan el crecimiento bacteriano.

Las bacterias, al tratarse de organismos microscópicos, presentan un tamaño bastante reducido. Como consecuencia de este pequeño tamaño, se necesita recurrir a microscopios para poder observarlas y emplear técnicas especiales al tratar con ellas. Otro inconveniente es que es complicado realizar mediciones individuales, por ello, para extraer conclusiones es necesario promediar los resultados obtenidos a partir de una gran población.

Por el contrario, su microscópico tamaño también les confiere ventajas en situaciones como la toma de nutrientes. La relación entre el volumen y la superficie es muy alta, por lo tanto, hay un mayor contacto directo entre la bacteria y el medio que la rodea, lo que se traduce en recibir las influencias ambientales de forma prácticamente inmediata. Debido a su gran superficie en contacto con el medio, la absorción de nutrientes y la eliminación de desechos es inversamente proporcional al tamaño de la célula, es decir, cuanto más pequeña es, mayor es la superficie en contacto y, como consecuencia, será capaz de absorber mayor cantidad de nutrientes y crecer más rápidamente.

3.2.2. Escherichia coli

La Escherichia coli, también conocida como E.coli, es el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Esta bacteria se encuentra en el intestino de animales y seres humanos, formando parte de la inmensidad de microorganismos que constituyen la flora intestinal y contribuyendo a la absorción de nutrientes en el mismo. Sin embargo, existen algunas variedades de E.coli que son bastante virulentas, pudiendo llegar a provocar la muerte.

Tiene forma capsular y pertenece al grupo de bacterias Gramnegativas, es decir, que es adquiere un color rojo en presencia de la tinción Gram.

El motivo por el que de entre todas las bacterias la E.coli es la más estudiada se debe principalmente a la simplicidad de su secuencia genética frente a la de otros organismos. Al conocer prácticamente su secuencia genética entera, se abre un mundo de posibilidades en el campo de la biología sintética, permitiendo de esta forma, una mayor manipulación del mismo.

Como consecuencia de la gran cantidad de estudios realizados sobre E.coli, además de su secuencia genética, también se conoce ampliamente su relación con el medio y con otros individuos. Por este motivo, debido a la gran densidad de información experimental sobre la misma, en PLASWIRES se emplea E.coli como el organismo al que mimetizar en las simulaciones y, así, replicar comportamientos biológicos que contribuyan a la comunidad científica.

3.3. Transporte de nutrientes

En lo que respecta a la nutrición, las bacterias toman del medio que las rodea los nutrientes necesarios para crecer y dividirse. Sin embargo, la membrana externa que rodea el citoplasma celular, como cualquier barrera de protección, impide el paso de la mayor parte de sustancias. Por este motivo, es necesario que existan mecanismos específicos para transportar los nutrientes al interior celular.

Los mecanismos principales para realizar el transporte de sustancias a través de la membrana son: **transporte pasivo** por **difusión simple** o **difusión facilitada** y **transporte activo**.

En lo que respecta al transporte pasivo, el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior no supone ningún coste metabólico, es decir, que la bacteria no tiene que gastar energía para obtener el alimento. El transporte comienza cuando se producen diferencias en la concentración a ambos lados de la membrana. En la difusión simple, las concentraciones a ambos lados se equilibrarán mediante el transporte de los nutrientes por los poros de la membrana de la bacteria, mientras que en la

difusión facilitada, es necesario un transportador, normalmente proteínas, que porte el alimento de un lado a otro.

Por otro lado, el transporte activo supone un gasto energético ya que los nutrientes se transportan en contra de un gradiente de concentración, es decir, de una zona con poca concentración a otra mayor concentración. Al igual que ocurría en la difusión facilitada, este mecanismo de transporte también se sirve de la ayuda de transportadores. Este tipo de transporte es el más empleado por las bacterias ya que, por motivos evolutivos, han tenido que aprender a sobrevivir en medios con baja concentración de nutrientes.

3.4. Medios de cultivo

Uno de los mecanismos más importantes para identificar a las bacterias, y en general a cualquier microorganismo, consiste en observar su crecimiento en una sustancia alimenticia creada artificialmente en el laboratorio, el **medio de cultivo**.

El medio de cultivo consiste en una solución acuosa en la que están presentes todas las sustancias necesarias para el crecimiento del organismo bajo estudio. Los medios de cultivo atienden a una clasificación en la que se dividen en tres tipos: **medios complejos**, **medios sintéticos** y **medios semisintéticos**.

En primer lugar, los medios complejos son muy ricos nutricionalmente, pero indefinidos químicamente ya que es producto de realizar infusiones y mezclarlo con materiales naturales como extracto crudo de carne. Por este motivo, no es el medio adecuado si lo que se desea es llevar a cabo un control nutricional preciso.

En lo que respecta a los medios sintéticos, se obtienen disolviendo agua destilada con cantidades concretas de sustancias químicas puras, orgánicas o inorgánicas. La composición concreta dependerá de la bacteria que se desee cultivar.

Finalmente, los medios semisintéticos son producto de una mezcla de los dos anteriores. Están formados tanto por sustancias químicas cuya naturaleza y cantidad conocemos y por sustancias indefinidas.

Independientemente, sea cual sea el medio de cultivo escogido, el cultivo se puede llevar a cabo tanto en medios líquidos como sólidos, a los que se les añade una sustancia gelificante para hacer el medio más denso. El gelificante más usado es el **agar-agar**, extraído de algas rojas y que tiene como característica importante el aguante a temperaturas muy altas, fundiéndose a partir de los 100°C.

3.5. Biofilms de bacterias

La mayoría de las bacterias se unen formando grupos conocidos como **colonias**. En ellas, un grupo de células con características similares se unen para actuar como un conjunto. Si bien es cierto que en algunas colonias cada bacteria que la conforma desempeña todas las funciones de un ser vivo independiente, en la mayoría existe una división del trabajo, dando lugar a células especializadas que se unen para formar **biofilms** o **biopelículas**.

En la naturaleza podemos encontrar a las bacterias en dos estados [8]. Por un lado están las **bacterias planctónicas**, que son aquellas también conocidas como de libre flotación debido que no se encuentran adheridas a ninguna superficie. Y por otro lado están las **bacterias biofilm**, las cuales están agrupadas con otras bacterias formando colonias y se encuentran adheridas a una superficie, bien sea viva o inerte. Un hecho destacable es que, aunque el porcentaje de bacterias que vive en estado planctónico sea muy inferior a aquel en el que se encuentran a biofilms, la mayoría de estudios se centran en las primeras debido a la complejidad que supone el estudio de las estructuras complejas formadas en los biofilms.

Sin embargo, debido a los objetivos planteados tanto en PLASWIRES como en el presente trabajo, nos vamos a centrar en el estudio de los biofilms y de los comportamientos que emergen de cada individuo para generar comportamientos colectivos.

Los **biofilms** bacterianos están constituidos por un grupo de bacterias adheridas a una superficie, viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. Su creación tiene su origen cuando una bacteria planctónica deja de estar en libre flotación y se adhiere a una superficie formando una comunidad. Además de constituir una mera agrupación de bacterias entre las que se realiza una división del trabajo, los biofilms constituyen una estrategia de supervivencia, de forma que las bacterias logran ventajas significativas frente a factores ambientales adversos.

El interior de los biofilms está formado por grandes colonias de bacterias adheridas a la superficie e incrustadas en una matriz extracelular formada por sustancia polimérica generada por las propias bacterias que lo conforman. Dicha matriz, además de por sustancias poliméricas, está formada por una gran cantidad de agua, llegando a representar el 97 % del total, y macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos. La producción de la matriz se ve influida por la calidad de los nutrientes presentes en el medio, de forma que a medida que dicha calidad es mayor se ha observado un aumento en la cantidad de bacterias adheridas.

Las colonias de bacterias se extienden de forma tridimensional desde la base a la que se han adherido. Aunque se encuentren dentro de una misma matriz, están separadas entre sí por huecos llamados *canales de agua* que permiten el flujo de líquido y actúan como un sistema circulatorio usado para el transporte y difusión, tanto de nutrientes como de oxígeno, así como para eliminar los productos de desecho

generados por las bacterias. La estructura tridimensional de los biofilms les hace resistentes a los mecanismos de defensa del huésped, en caso de ser una superficie viva, ya que al ser estructuras grandes no pueden ser comidas por otras bacterias más grandes.

El ciclo vital de un biofilm se suele dividir en tres fases: **adhesión**, **crecimiento** y **desprendimiento**.

Durante la primera fase, la superficie debe ser adecuada siendo más fácil la adhesión a aquellas más asperas. Las bacterias, una vez percibida la superficie, forman una unión activa con el sustrato ayudándose de los apéndices, en caso de tenerlos, como fimbrias, flagelos o pili. Hay varios factores, como la temperatura o la concentración de nutrientes, que pueden influir considerablemente en esta fase.

En la fase de crecimiento, una vez que la bacteria se ha adherido, comienza a dividirse de forma que las bacterias hijas se extienden alrededor del punto en el que se produjo la unión, formando así, una nueva colonia dentro del biofilm. A medida que se dividen, van colonizando la superficie segregando las sustancias polisacáridas para contribuir a la formación de la matriz y apilándose formando estructuras tridimensionales.

Finalmente, en la etapa de desprendimiento, algunas de las bacterias se liberan de la matriz con el objetivo de migrar para colonizar nuevas superficies. El desprendimiento puede darse, o bien como resultado de fuerzas externas al biofilm o de procesos inducidos por éste.

3.6. Crecimiento

Al introducir una bacteria en un medio con el objetivo de que se reproduzca para generar más individuos, es necesario establecer bien todos los parámetros que contribuyen a que se produzca este crecimiento. Además, cada tipo de bacterias presenta unos parámetros propios como puede ser el **tiempo de generación** y la **tasa de crecimiento media**.

Siempre y cuando las condiciones sean favorables, las bacterias inoculadas o introducidas en un medio tienden a reproducirse para asegurar la supervivencia de su información genética. La reproducción bacteriana tiene lugar cuando éstas alcanzan un determinado tamaño, momento en el cual comienzan un ciclo de división del que resultarán dos individuos, dando lugar a un crecimiento exponencial. El tiempo desde que el proceso comienza hasta que acaba con la formación de dos bacterias independientes es conocido como el **tiempo de generación**. Este tiempo suele variar según la raza de bacterias y las condiciones en el medio, ya que por ejemplo, en caso de escasez de nutrientes, el crecimiento no podrá darse al mismo ritmo por lo que

las bacterias tardarán más en llegar al tamaño idóneo para dividirse aumentando, por tanto, el tiempo de generación.

Otra medida fundamental es la **tasa de crecimiento media**, calculada a partir del tiempo de generación. Este parámetro nos permite conocer el número de generaciones por unidad de tiempo, es decir, la tasa a la cual una población crece.

3.6.1. Fases del crecimiento

El crecimiento de una colonia de bacterias pasa por cuatro fases sucesivas (Fig. 3.3). Cada una describe el comportamiento colectivo que emerge de los diferentes comportamientos individuales de cada bacteria que constituye la colonia.

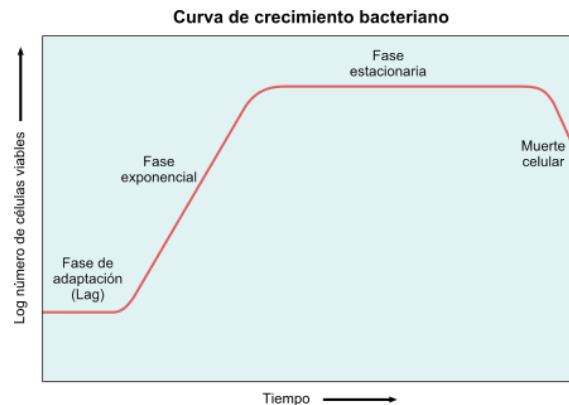


Figura 3.3.: Fases del crecimiento de una colonia

La **fase de latencia** o de **adaptación**, tiene lugar cuando las bacterias son inoculadas en el medio de cultivo. El tiempo de duración de esta fase depende del tiempo de adaptación que necesite cada tipo de bacteria. El número de individuos en esta fase corresponde al introducido en el medio ya que hasta que la adaptación no se complete no empezarán a dividirse.

La **fase de crecimiento exponencial**, representa el periodo de tiempo en el que el crecimiento es máximo. La división ocurre a la mayor velocidad admisible establecida por la tasa de crecimiento media. El crecimiento se mantiene de forma exponencial aproximándose hasta un límite superior K . Una vez alcanzado K , el crecimiento de la población se estabiliza llegando a la **fase estacionaria**. En esta fase el número de bacterias en crecimiento y las que no son prácticamente iguales. Sin embargo, esto ocurre en medios de cultivo líquidos. En medios sólidos, además de la estabilización entre las que crecen y no, la llegada a esta fase depende en gran medida tanto de la acumulación de desechos y la falta de oxígeno en el interior de la colonia como a cambios en el entorno, como el pH [9].

Finalmente, factores como los desechos generados por las bacterias, la falta de

oxígeno en el interior de la colonia o las propias bacterias muertas, empiezan a acumularse dando lugar a la **fase de muerte**. En esta última fase la curva de crecimiento decrece como consecuencia que de no hay crecimiento alguno.

En medio sólido, el comportamiento de las diferentes fases por las que atraviesa una colonia podemos observarlo a gran escala gracias a la formación de un **anillo externo** [10]. En el momento en el que las bacterias comienzan a dividirse, el tamaño de la población aumenta exponencialmente y tanto los nutrientes como el oxígeno se consumen a mayor velocidad. Por este motivo, y para asegurar su supervivencia, las bacterias comienzan a expandirse para llegar a zonas con alimento. A medida que la colonia se expande comienza a adoptar forma circular, aunque bajo situaciones de carencia de nutrientes o resistencia al medio, su perímetro se vuelve irregular.

Como consecuencia de la forma que adopta la colonia, se obtiene un anillo externo (Fig. 3.4) en el que se sitúan las bacterias que están creciendo debido a que son capaces de acceder a nuevas zonas con comida, mientras que las situadas en el interior han agotado recursos como los nutrientes y el oxígeno, parando su ciclo vital.

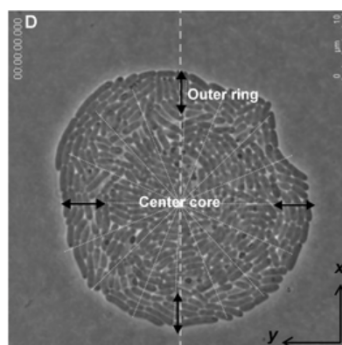


Figura 3.4.: Formación del anillo externo en una colonia [10]

El anillo se mantendrá constante (Fig. 3.5), es decir, con el mismo grosor, siempre y cuando haya nutrientes de los que seguir consumiendo. En el momento en que comience a haber carencia de nutrientes, el grosor se irá reduciendo progresivamente hasta agotar todo el alimento.

3.6.2. Técnicas de cultivo

Hoy en día, en los laboratorios hay dos técnicas que se emplean para la generación o producción de bacterias: **cultivo continuo** y **cultivo en sistemas cerrados**.

Los cultivos continuos, en medios líquidos, proponen una renovación constante del alimento así como una eliminación de los productos de desecho. El objetivo principal es lograr que el coeficiente de crecimiento tienda a cero, es decir, el número de

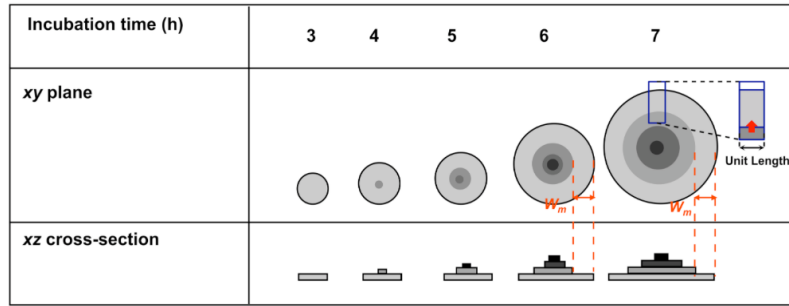


Figura 3.5.: Grosor constante del anillo [11]

bacterias creciendo y muriendo sea aproximadamente el mismo, consiguiendo así un sistema en equilibrio. De esta forma se estimula a las bacterias a crecer indefinidamente, normalmente con el fin de aprovechar parte de los desechos generados.

En lo que respecta a los cultivos en sistemas cerrados, al contrario que ocurría en los cultivos continuos, el alimento no es repuesto ni los productos de desecho eliminados. Este tipo de cultivos, bien sean líquidos o sólidos, se realizan en espacios limitados. Debido a las restricciones mencionadas, la curva de crecimiento de las colonias cultivadas en este tipo de sistemas también cuenta con una fase de muerte.

Capítulo 4

Arquitectura del sistema

En el estado del arte (Cap. 2) se han presentado las principales herramientas empleadas en algún proyecto relacionado con biología sintética. Todas ellas presentan características que las hacen, en mayor o menor medida, diferentes al resto. Y es, debido a sus características y a determinadas decisiones dentro del proyecto PLASWIRES en el que se engloba este trabajo de fin de grado, por lo que el elegido fue GRO [4].

La arquitectura global del sistema (Fig. 4.1) está compuesta por dos partes principales: *gro*, un lenguaje propio de especificación, y módulos que aporten funcionalidad extra. Para toda la funcionalidad nueva que desee añadirse, se ha decidido crear un módulo independiente a fin de mantener la mayor modularidad y separabilidad de tareas posible. En el estado previo a las aportaciones (Cap. 5-6), **CellEngine** [12] es el único módulo presente, haciendo las funciones de motor físico.

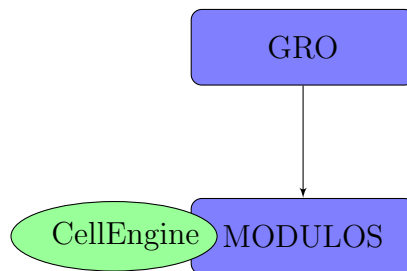


Figura 4.1.: Arquitectura con CellEngine

4.1. GRO

Como ya se introdujo previamente (Sec. 2.1.4), GRO [4] es un *framework* creado y principalmente desarrollado por Eric Klavins. Su objetivo es permitir a los investigadores estudiar comportamientos colectivos mediante la especificación a alto nivel de

comportamientos individuales. Una novedad introducida por GRO, a diferencia del resto de *frameworks* vistos (Cap. 2), es que las especificaciones están implementadas en un lenguaje creado para ello, **gro**.

El lenguaje *gro* está basado en CCL [13], otro lenguaje de especificación creado por Eric Klavins, y está implementado en C++. Pretende hacer más sencillas las tareas de especificación, diseño y simulación de nuevas ideas relacionadas con comportamientos colectivos en un entorno 2D, en el que la posición espacial juega un papel importante como en los casos de crecimiento celular o difusión de señales.

En *gro* se combinan ideas de sistemas distribuidos y de computación paralela, ya que los algoritmos desarrollados en ambos campos son aplicables a entornos biológicos, en los que hay varios miles de individuos ejecutando al mismo tiempo. En cambio, también hay determinadas limitaciones a la hora de aplicar estos algoritmos a la biología. La mayoría de estas limitaciones vienen impuestas por asunciones que en computación pueden hacerse pero que en sistemas biológicos no, como la asignación de un identificador único a cada nodo (o individuo).

Para obtener el paralelismo, los programas *gro* están constituidos por un conjunto de *guardas*. Las *guardas* son sentencias dotadas con la forma *<guarda:comando>*, siendo *guarda* una expresión booleana y *comando* las acciones vinculadas al cumplimiento de la *guarda*. En cada uno de los pasos que conforman la simulación, se evaluará cada *guarda*. De esta forma, si la evaluación es a *true* se evaluará y ejecutará el contenido de *comando*. Pero, ¿Cómo contribuyen las *guardas* a obtener paralelismo?. El mecanismo para obtenerlo a través de las *guardas* es que éstas no se ejecutan en el mismo orden en el que están especificadas en el programa *gro*.

Además, *gro* permite especificar a varios niveles de detalle dependiendo de la granularidad en el comportamiento individual que se desee. El lenguaje presenta bastante flexibilidad en este aspecto de forma que queda a gusto del programador la elección de emplear el nivel de abstracción más adecuado para el objetivo perseguido.

4.2. Ciclo de ejecución de GRO

Internamente, *gro* tiene un ciclo de simulación (Fig. 4.2) en el que se llevan a cabo todas las actualizaciones de los comportamientos individuales de los cuales emergerá el comportamiento colectivo.

Cada ciclo de simulación se repite en función del valor asignado al parámetro *dt* (delta de tiempo al que equivale un fotograma), especificado en el programa *gro*. En cada *dt* se llevan a cabo todas las fases enumeradas en Fig. 4.2 después de parsear el programa *gro* y realizar la comprobación de tipos. Las localizaciones iniciales y orientaciones de las células también son resueltas en este paso previo a la

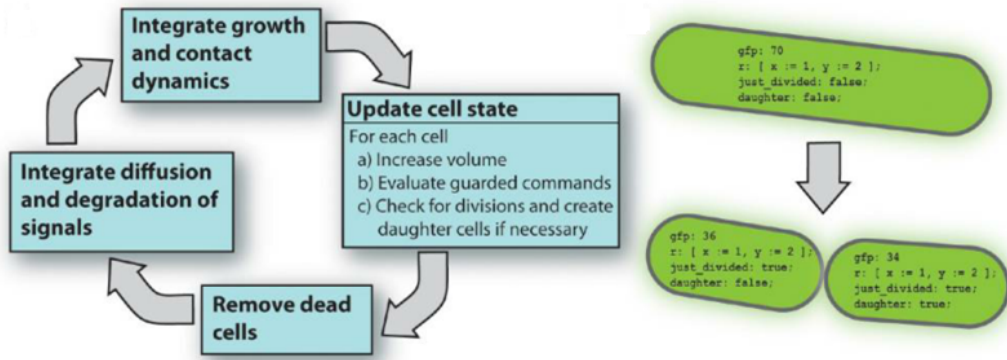


Figura 4.2.: Ciclo de *gro*. Imagen tomada de [4]

simulación.

El ciclo comienza con la actualización del estado de cada célula presente en la simulación. En esta primera fase, se procede a incrementar el volumen, evaluar las directrices contenidas en las *guardas* así como comprobar si es necesario dividir y, por consiguiente, crear las células hijas.

En lo que respecta al incremento de volumen, este se realiza de acuerdo a la ecuación diferencial siguiente:

$$\frac{dV}{dt} = kV$$

De esta forma, según la ecuación diferencial implicada en la adquisición de volumen, cada célula presente en la simulación incrementa su volumen a lo largo del tiempo conforme a una constante k y al volumen acumulado hasta entonces. Por lo tanto, el incremento se lleva a cabo de forma exponencial (Fig. 4.3).

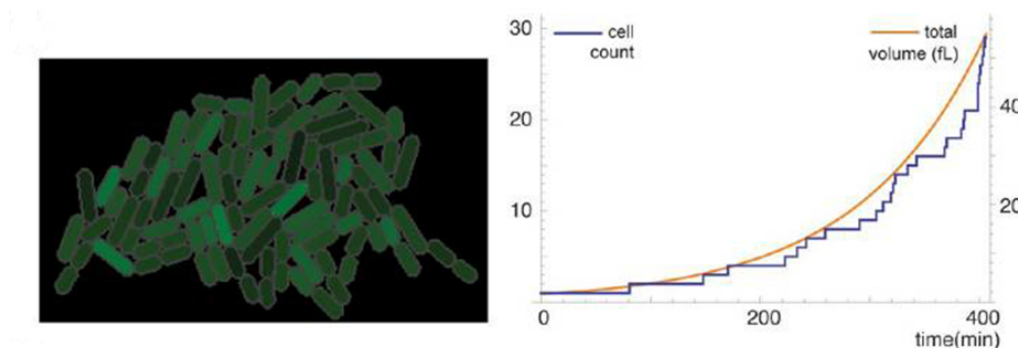


Figura 4.3.: Captura de una pequeña colonia y de su incremento de volumen de forma exponencial a lo largo de la simulación [4].

Las células incrementan su volumen en cada dt hasta llegar a un umbral previamente especificado en el programa *gro*. Si dicho valor es alcanzado se procede a la división. Sin embargo, aunque el valor este establecido de forma fija se le añade cierto ruido adicional para introducir la arbitrariedad presente en la naturaleza.

En el instante de división (Fig. 4.2), la célula hija recibe una copia del código que se ejecutaba en su predecesora. Sin embargo, hay determinadas diferencias en lo que respecta a las variables numéricas presentes en la célula madre. Las variables numéricas suelen representar el valor correspondiente a concentraciones de moléculas y no sería muy acertado, desde el punto de vista biológico, copiar ese valor exacto. Por este motivo, se asigna a cada sucesora más o menos la mitad del valor, pero introduciendo cierta variabilidad aleatoria, como ocurriría en la naturaleza. Además, hay variables que indican el estado de la célula por lo que también diferirán, ya que cada célula se rige por un comportamiento independiente y sometido a continuas evoluciones.

A continuación, se ejecutan las fases de eliminación de células muertas e integración de difusión y/o degradación de señales. Las señales se han modelado por medio de la creación de una malla 2D. En ella cada una de las celdas contiene una concentración de la señal que se difundirá y/o degradará a lo largo de la simulación. Las señales podrán ser emitidas, sentidas o absorbidas por las células presentes y se usarán frecuentemente como mecanismo de comunicación célula-célula.

Las dos últimas fases descritas previamente, si bien es cierto que aportan valor a las simulaciones, no son usadas actualmente en la versión empleada en el laboratorio LIA. Una de las razones, se debe a la mala eficiencia obtenida al incluir dichas funcionalidades a los programas *gro* suponiendo una pérdida importante en tiempo de ejecución y en número total de células obtenidas.

La última fase corresponde a la actuación del motor físico, el cual resolverá los solapamientos entre células fruto tanto del movimiento como del crecimiento de cada una. CellEngine [12], el motor físico actual, es el sustituto de Chipmunk [5] como resultado de las numerosas limitaciones en potencia y eficiencia presentadas por este último. Las mejoras tras su introducción han supuesto la obtención de muchas células en poco tiempo, frente a las pocas generaciones obtenidas con Chipmunk antes de sobrecargar el motor.

CellEngine está implementado como un módulo (Fig. 4.1) que se comunica con GRO con el objetivo de obtener la mayor modularidad posible. El motor representará una malla 2D en la que se localizarán cada una de las células mediante un sistema de coordenadas. Sin embargo, para que la representación en cada instante de la simulación sea fidedigna, es necesario que la malla reciba las actualizaciones sobre el estado de cada célula, bien sea incremento de volumen o división, con el fin de representarlas. Por lo tanto, mediante una llamada al módulo, GRO debe comunicar

dichas actualizaciones de estado.

Parte II.

DESARROLLO Y APORTACIONES

Capítulo 5

Módulo de consumo de nutrientes

Los nutrientes juegan un papel determinante en el control del crecimiento de una colonia de bacterias. Su presencia supone el crecimiento de las células de forma continua hasta el agotamiento de los mismos, momento en el cual comenzará la competición por los recursos dando lugar a interesantes comportamientos que merece la pena analizar.

Hay numerosas restricciones que provocan la transición entre cada una de las fases del crecimiento de una colonia (Sec. 3.6). Además, la velocidad de transición también es dependiente del grado impuesto por las mismas. Por ejemplo, para el caso concreto de los nutrientes, la velocidad a la que la colonia llega a la fase estacionaria será mayor cuantos menos nutrientes haya, mientras que si hay alta concentración de los mismos la velocidad bajará drásticamente.

En cambio, *gro* no impone restricción de ningún tipo, dando lugar a un crecimiento continuo en fase exponencial (Fig. 4.3). Esta carencia puede ser de utilidad si la finalidad es investigar comportamientos no influidos por ninguna de estas restricciones, así como en caso de que se desee realizar pruebas rápidamente. Sin embargo, los resultados obtenidos no son realistas, ya que en el medio natural es prácticamente imposible que una colonia se mantenga en fase exponencial de forma indefinida debido, como se mencionaba, a la gran cantidad de distorsiones introducidas por el medio.

Para solucionar la falta de realismo, se se ha decidido implementar un módulo, **Cell-Signal**, que permita modelar el comportamiento de una colonia de bacterias ante la restricción de nutrientes. La incorporación de dicha restricción permitirá ajustar el crecimiento de la colonia, de forma que tras una primera etapa de crecimiento exponencial se llegará a una fase estacionaria debido a la ausencia de nutrientes.

El módulo se ha desarrollado en C ya que CellEngine, el módulo que implementa el motor físico, está también desarrollado en C. La arquitectura del sistema resultante

(Fig. 5.1) no difiere mucho de la arquitectura inicial (Fig. 4.1), añadiendo únicamente la funcionalidad de consumo de nutrientes en un módulo independiente. De esta forma, se cumple la máxima de conservar la mayor modularidad y separabilidad de tareas posible.

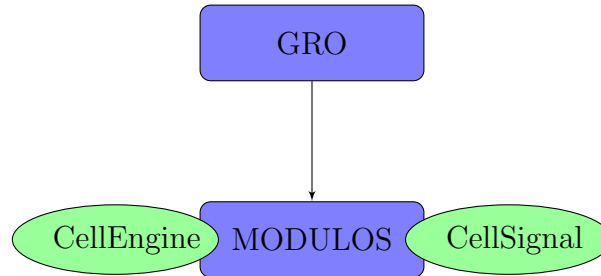


Figura 5.1.: Arquitectura modificada

Como se mencionaba, el objetivo perseguido con la creación de este nuevo módulo es el de restringir la cantidad de alimento presente en una simulación, de tal forma que se puedan observar comportamientos realistas. En las simulaciones la espacialidad es muy importante, ya que permite representar la interacción entre individuos y de éstos con el medio. Tras el desarrollo de CellSignal, la interacción de los individuos con el medio se lleva a cabo de forma diferente ya que para crecer deben comer.

Para conservar el factor espacial en la distribución de los nutrientes en el medio, CellSignal implementa una malla 2D que conserva los nutrientes disponibles en cada momento para cada punto del espacio. La malla está constituida por un número de celdas, establecido en la creación de la misma, que almacenarán la cantidad de alimento disponible además de otros factores que afectan al consumo.

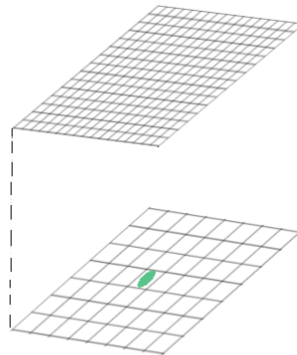


Figura 5.2.: Relación entre las mallas de CellEngine (abajo) y CellSignal (arriba)

Es necesario establecer una relación entre la posición que ocupan las bacterias en la malla del motor físico y en la malla de nutrientes (Fig. 5.2), con el fin de que

las bacterias sólo puedan alimentarse de aquellas celdas adyacentes a su posición. Una ventaja de disponer de una malla independiente para alojar los nutrientes, es la posibilidad de definir diferentes granularidades. De esta forma, es posible tener una distribución de los nutrientes mucho más precisa.

La separación de tareas dentro del módulo se divide en tres partes principales o submódulos. En primer lugar, en el submódulo `grid.c` se implementa toda la funcionalidad referente a la malla 2D sobre la que se situarán los nutrientes. En segundo lugar, en el submódulo `nutrient.c` se implementa toda la funcionalidad relacionada con el consumo de los nutrientes disponibles en la malla implementada en `grid.c`. Y finalmente, el submódulo `cellsignal.c` es el submódulo principal, encargado de orquestar el funcionamiento de los otros dos.

A continuación, se explicarán en mayor detalle cada uno de los submódulos, exponiendo la funcionalidad implementada en cada uno.

5.1. Submódulo principal: `cellsignal.c`

Este submódulo es el núcleo del módulo CellSignal (Fig. 5.3), encargado de comunicarse con *gro* así como de orquestar el funcionamiento de los otros dos submódulos. Al ser este submódulo la piedra angular de CellSignal, se ha decidido darle el mismo nombre, **cellsignal**.

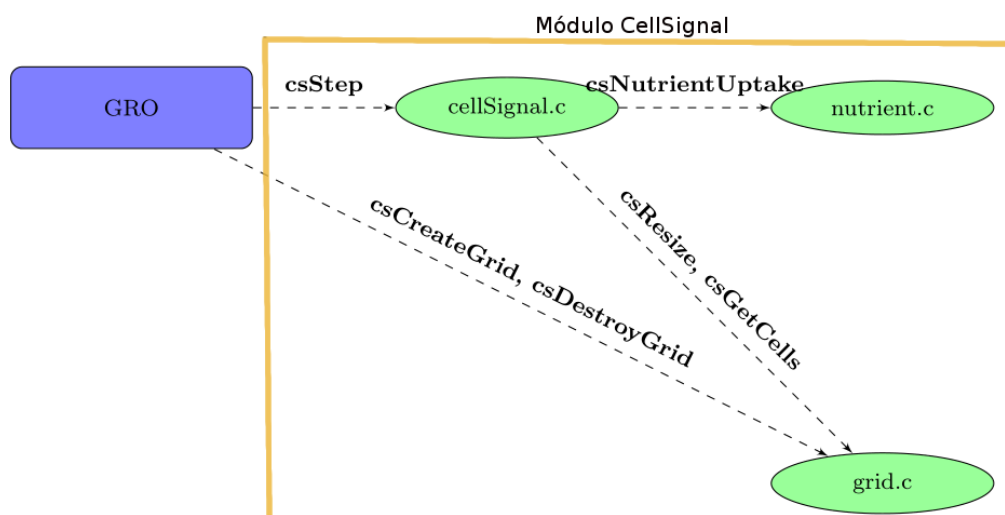


Figura 5.3.: Comunicación entre módulos de CellSignal.

La comunicación entre *gro* y el módulo CellSignal surge de la necesidad, por parte de *gro*, de comunicar las coordenadas de cada una de las bacterias. Como respuesta,

CellSignal, devolverá la cantidad disponible tras el consumo en una de las celdas. Este valor será utilizado para computar el crecimiento de cada bacteria en *gro* (Cap. 6).

El submódulo cellsignal.c está constituido únicamente por una función, **csStep**, encargada de recibir las coordenadas de todas las bacterias presentes en la simulación en cada *dt*.

Pseudocódigo 5.1: csStep

```

Entrada: Lista de coordenadas (x,y) de las bacterias ,
        Numero total de bacterias (N)
Salida: Lista de nutrientes disponibles (Ldisp)

PARA i=0 HASTA N
| Traducir coordenadas (x,y)  $\rightarrow$  (x',y')
| if (x',y') fuera de la malla then Amplia (csResize)
| Extraer las celdas que ocupa bacteriai (csGetCells)
| Ldisp[i] = Consumir nutrientes (csNutrientUptake)

return Ldisp

```

En lo que respecta a la implementación de csStep (Pcod. 5.1), consiste en una iteración sobre todas las coordenadas recibidas correspondientes a todas las bacterias presentes en la simulación. Para posteriormente llamar, tanto a las funciones del submódulo grid.c como nutrient.c, con el objetivo de obtener la cantidad aún disponible en cada una de las celdas de las que ha consumido cada bacteria.

En el diseño de CellSignal se estableció el origen de coordenadas en la esquina superior izquierda de la malla implementada en grid.c. Por este motivo, y debido a que las coordenadas recibidas se expresan con respecto al origen de coordenadas del motor físico, en el que el origen es el centro de la malla, es necesario traducir de un sistema de coordenadas a otro. Posterior a este primer paso de la implementación de csStep, se ampliará la malla en caso de ser necesario. Si la bacteria se sitúa más allá de los límites de la malla, ésta se ampliará, de tal forma que entre completamente en el interior de la malla.

Una vez resueltas todas las acciones que involucran a la malla, es hora de proceder al consumo de alimento. Para ello, en primer lugar, es necesario obtener las celdas de la malla de nutrientes que abarca la bacteria. Una vez conocidas, se procede a consumir de una de ellas (Pcod. 5.3). Tanto la elección de las celdas como la cantidad consumida se realiza de forma aleatoria para que la simulación sea más realista.

El resultado de todos los pasos mencionados en cada iteración generará, en última instancia, la cantidad aún disponible en la celda escogida. Una vez finalizado este

paso para todas las coordenadas recibidas, se devolverá a *gro* una lista con todas las cantidades calculadas para cada una de ellas. Dichas cantidades serán utilizadas por *gro* para computar la cantidad de biomasa que cada bacteria debe crecer.

5.2. Submódulo de mallado: *grid.c*

En este submódulo se implementa toda la funcionalidad referente a la creación y destrucción de la malla, así como la funcionalidad que permite modificarla y gestionarla.

Las funciones de **creación** (*csCreateGrid*) y **destrucción** (*csDestroyGrid*), a diferencia del resto, no son invocadas por el submódulo *cellsignal.c* sino que son llamadas directamente desde *gro*.

En el momento de la creación de la malla, son varios los parámetros demandados a *gro*: número total de nutrientes por celda, tasa a la que se va a consumir, variabilidad respecto a la tasa, número de celdas que forman un lado de la malla (debido a que es cuadrada), tamaño de cada una de ellas y un parámetro que define el modo en el que queremos asignar la concentración de nutrientes a cada celda. Todos estos valores, fijados desde *gro*, se han definido respecto a los datos con los que se desea llevar a cabo la simulación en curso y al suceso que se desea analizarse. Debido a la importancia para retener estos valores a lo largo de toda la simulación, durante el proceso de creación todos serán almacenados en las estructuras internas usadas en la implementación.

Un parámetro importante es el que define el modo en que queremos realizar la asignación de nutrientes (Pcod. 5.2), pudiendo ser **HOMOGENEOUS** y **GRADIENT**. Tanto en el momento de la creación de la malla como de la ampliación de la misma, se asigna una concentración de nutrientes a cada celda en base a una función distancia. Dicha función distancia permite mantener diferentes concentraciones según cómo de lejos esté cada celda respecto al centro de la malla y considerando una distancia máxima especificada. Gracias a esta función el “mapa” de distribución del alimento permite simular una placa de Petri, posicionando los nutrientes dentro de ella y haciendo cero la concentración más allá del valor del radio máximo indicado.

Por un lado, el modo **HOMOGENEOUS** representa una función escalón. Dicha función nos permite introducir la misma cantidad de nutrientes a todas las celdas salvo a aquellas que se encuentren más allá del radio máximo, en cuyo caso, el valor es cero. Por otro lado, el modo **GRADIENT**, asigna a cada celda una concentración diferente condicionada a la distancia del centro de la malla. De esta forma, el mapa final presenta una malla en la que las celdas muy cerca del centro tienen prácticamente la cantidad máxima de comida, mientras que a medida que nos alejamos la

cantidad se va reduciendo progresivamente.

Pseudocódigo 5.2: Función auxiliar de calculo de concentración de nutrientes

Entrada: Centro (x,y) , Celda $(x1, y1)$, Concentracion maxima (C_{max})
Salida: Concentracion de nutrientes que se asignara a una celda (C_s)

```
Distancia =  $\sqrt{(x - x1)^2 + (y - y1)^2}$ 

Switch (MODO)
{
  case 'HOMOGENEOUS':
    | if Distancia <= RADIOmax then
    |   Cs = Cmax
    | else
    |   Cs = 0

  case 'GRADIENT':
    | Cs =  $((\frac{-C_{max}}{RADIO_{max}}) * Distancia + C_{max})$ 
}

return Cs
```

Esta implementación aporta bastante flexibilidad a la hora de plantear nuevos escenarios sobre cómo sería posible distribuir los nutrientes. Únicamente habría que añadir un nuevo modo y especificar cómo queremos que se reduzca el alimento en cada celda en función de la distancia.

En lo que respecta a la **modificación** de la malla creada, el único caso contemplado es aquel en el que se necesite una malla de mayor tamaño. La labor de la función de ampliación (csResize) consiste únicamente en añadir la cantidad de celdas necesaria para incluir a la bacteria desencadenante de la ampliación. La adición de las celdas se hará por igual a cada uno de los cuatro lados de la malla. Además, como se mencionaba, la concentración de alimento que se añadirá a estas nuevas celdas dependerá del modo de distribución de alimento escogido en la creación de la malla.

La otra acción principal implementada en el módulo es aquella que involucra el **acceso a la información** contenida en la malla (csGetCells). Actualmente, la única función con este fin es la de consultar las celdas que ocupa una bacteria, las cuales abarcarán una región rectangular en la malla. En base a la coordenada de la bacteria se extraerán las celdas en el que está contenida, devolviendo un intervalo con las celdas del extremo superior izquierdo y el extremo inferior derecho. El motivo por el que únicamente se devuelven los extremos del intervalo es el de suponer una carga en memoria lo menor posible.

5.3. Submódulo de consumo: nutrient.c

En este módulo solo hay implementada una tarea (Pcod. 5.3) pero que, sin embargo, es la más importante. Esta función (csNutrientUptake) será la última en ejecutarse en cada llamada a la función principal csStep, y dará lugar al resultado que se comunicará a *gro*. Dicho resultado, correspondiente a la cantidad aún disponible en la celda, actuará como condicionante de crecimiento de la bacteria, y en consecuencia, de la colonia haciendo posible la transición a fase estacionaria.

Pseudocódigo 5.3: csNutrientUptake

Entrada: Intervalo $[(fila1_{sup}, col1_{sup}), (fila2_{inf}, col2_{inf})]$

Salida: Concentracion disponible de nutrientes (Disponible)

PARA $bacteria_i$:

```
| Escoger aleatoriamente celda en Intervalo = (fila , col)
| if Disponible(celda(fila , col)) > TASA then
|     Consumido = Consumir TASA (+-variabilidad) en celda(fila , col)
| else
|     Consumido = Consumir cantidad aleatoria entre 0 y Disponible
|     Disponible = Disponible(celda(fila , col)) - Consumido
```

```
return Disponible
```

El consumo de nutrientes está condicionado por los parámetros establecidos en la creación de la malla. Por razones de diseño y en vista a una ampliación de la funcionalidad implementada en el módulo, cada celda almacena, además de la cantidad total de nutrientes, la tasa máxima que cada bacteria puede consumir en cada iteración y una variabilidad que afecta a dicha tasa. La variabilidad es un parámetro muy útil ya que aporta el factor ruido presente en la naturaleza, al mismo tiempo que contribuye a aportar realismo.

Como medida adicional de ruido, se ha incluido aleatoriedad tanto en la elección de la celda de la cual consumir de entre todas las incluidas en el ámbito de la bacteria como en la cantidad consumida. La cantidad consumida está sujeta a la cantidad disponible en la celda de la que se va a consumir. Si la cantidad disponible es suficiente, la bacteria consumirá de acuerdo a la tasa máxima establecida. En cambio, si comienza a haber escasez de nutrientes la cantidad consumida nunca podrá corresponder a la tasa máxima, reduciendo por tanto el crecimiento de la bacteria.

Capítulo 6

Cinética de crecimiento

Como se ha tratado de representar a lo largo de los capítulos anteriores, si se quieren conseguir comportamientos ajustados a procesos biológicos reales, es necesario establecer restricciones en el crecimiento. De entre los muchos factores que condicionan el crecimiento, los nutrientes es uno de los mas esenciales.

Hasta ahora, el crecimiento de las colonias simuladas en *gro* se mantenía indefinidamente en fase exponencial debido a la continua situación de abundancia nutritiva. Con la incorporación de la malla de nutrientes (Cap. 5), se representa el medio como un reservorio de alimento finito. Sin embargo, no es suficiente con consumir una cantidad de nutrientes de dicho reservorio, si no que es necesario realizar la transformación a biomasa, es decir, el volumen que debe crecer la bacteria.

En *gro*, la ecuación que implementa la transformación a biomasa únicamente relaciona la tasa de crecimiento y el volumen de la misma:

$$\frac{dV}{dt} = kV, \text{ donde } k = \text{tasa de crecimiento (fL)}$$

De esta forma, mientras que la tasa de crecimiento (Correspondiente a E.coli) se mantiene constante, el volumen va aumentando conforme avanza la simulación. Por este motivo, el crecimiento es exponencial y dependiente únicamente del volumen adquirido durante cada dt .

Tras la implementación del módulo CellSignal, ha sido necesario condicionar la ecuación de crecimiento. La nueva ecuación que define la cinética del crecimiento debe depender de la cantidad de comida disponible, ya que las bacterias en su entorno no crecen a la misma velocidad en situación de abundancia y de escasez, ralentizando su crecimiento en este ultimo caso.

6.1. Ecuación de Monod

Para modelar el crecimiento condicionado por la cantidad de nutrientes disponibles, se ha implementado en *gro* la ecuación del modelo matemático de Monod [14]. Este modelo, describe el comportamiento de la tasa de crecimiento de poblaciones de microorganismos en situaciones en las que hay una limitación de nutrientes (Fig. 6.1).

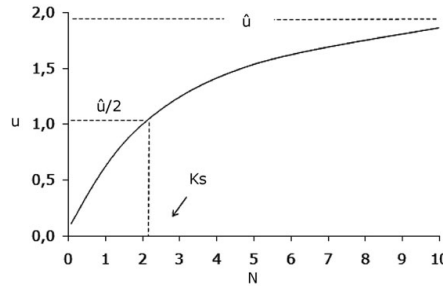


Figura 6.1.: Curva de crecimiento de poblaciones de Monod.

N = concentración disponible de alimento, μ = tasa de crecimiento

Como se mencionaba, es un modelo empleado sobre poblaciones pero, sin embargo, *gro* es un IbM en el que los comportamientos se definen a nivel individual. Este hecho, hace pensar si el modelo de Monod es entonces el más adecuado para modelar la transformación a biomasa. En relación a esto, es necesario recordar que una de las virtudes de los IbMs es la capacidad de generar comportamientos colectivos o poblacionales que emergen del conjunto de todos los comportamientos individuales.

La ecuación de Monod presenta tanto parámetros dependientes del tipo de bacteria como experimentales. Todos ellos serán definidos según las características del tipo de bacterias bajo estudio en la simulación y de los sucesos que deseen analizarse. En el caso particular de PLASWIRES, únicamente se realizan simulaciones de *E.coli*, por ello, algunos parámetros serán fijos en todas las simulaciones:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

donde:

μ = Tasa de crecimiento (fL)

μ_{max} = Tasa máxima específica del tipo de bacteria bajo estudio

S = Concentración de los nutrientes limitantes

K_s = Constante de velocidad media, es decir, el valor de S cuando $\frac{\mu}{\mu_{max}} = 0,5$

De entre todos los parámetros que conforman la fórmula, μ_{max} , es el único que se mantiene inalterable en todas las simulaciones. Cada cepa o raza de bacterias tiene

una velocidad máxima de crecimiento a la que puede dividirse como consecuencia de la duración del tiempo de generación (Cap. 3).

Debido a la estructura con forma de malla en la que se han distribuido los nutrientes (Sec. 5.2), en vez de una limitación de nutriente a nivel global, cada celda de la malla presenta su propia concentración de nutrientes. Por este motivo, se ha modelado por medio de la ecuación de Monod el desgaste de los nutrientes para cada una de las celdas. En esta aproximación, lo que se pretende es modelar la reducción en la tasa de crecimiento (μ) a medida que la cantidad disponible de alimento (S) en una celda se va consumiendo, es decir, que a medida que se reducen los nutrientes la capacidad de una bacteria de adquirir biomasa se ralentiza.

Por último, en lo que respecta al parámetro K_s , es junto con μ_{max} un parámetro especificado al comienzo de la simulación y que es obtenido de forma empírica. Este parámetro permite definir el valor de la concentración de nutrientes disponible en el que la tasa de crecimiento alcanza su valor medio, es decir, nos permite establecer dónde queremos situar el punto de inflexión en la curva descrita en el modelo de Monod.

Gracias al parámetro K_s , podemos acelerar o retrasar la velocidad de la tasa de crecimiento (Fig. 6.2), para los distintos valores correspondientes a la concentración disponible de nutrientes. Cuanto más pequeño sea el valor K_s más tarde comenzará a decrecer la curva, pero el punto de inflexión será mucho más acentuado. En cambio, si su valor es alto la deceleración será considerablemente más progresiva.

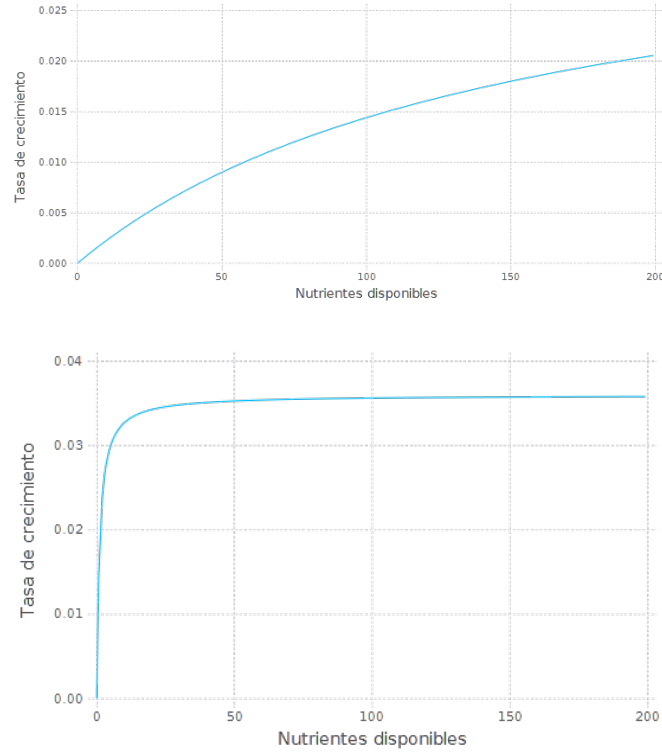


Figura 6.2.: K_s alto y bajo, suponiendo una cantidad total de nutrientes igual a 200.
Tasa para K_s bajo = 1.0, Tasa para K_s alto = 150

Como podemos ver en las imágenes y teniendo en cuenta la forma de la fórmula de Monod, si aumentamos el valor de K_s se produce una reducción en los valores que va adquiriendo la tasa de crecimiento en todas las iteraciones, alejándose bastante de μ_{max} . En cambio, si disminuimos su valor, los posibles valores que irá tomando la tasa de crecimiento a lo largo de las iteraciones son muy próximos a μ_{max} .

Parte III.

RESULTADOS

Capítulo 7

Simulaciones y resultados

En este capítulo se van a presentar todos los nuevos parámetros relacionados con el objetivo de este trabajo, la implementación y simulación condicionada por un entorno con limitación de nutrientes. Además, también se mostrará el efecto que produce la modificación de los mismos en las simulaciones resultantes.

En primera instancia, se mostrarán todos los parámetros relacionados con la fórmula de Monod empleada en la transformación a biomasa (Cap. 6). Posteriormente, se analizarán todos aquellos relacionados con la creación de la malla, así como contrastar los resultados obtenidos con la literatura disponible con el fin validar el trabajo realizado.

Principalmente, los objetivos que se persiguen con la implementación de nutrientes son tres. En primer lugar, la obtención de la transición entre la fase exponencial y estacionaria, con el fin de describir un crecimiento más realista. En segundo lugar, ver de que modo influyen los nutrientes en la forma final de la colonia. Y finalmente, analizar el comportamiento en situaciones en las que se da competencia entre individuos debido a la limitación impuesta por los nutrientes.

7.1. Estudio de los parámetros

7.1.1. Parámetros de la curva de crecimiento

Como se mencionaba en el capítulo 6, se decidió sustituir la ecuación que modelaba el crecimiento por la ecuación descrita en el modelo matemático de Monod [14]. Los motivos que impulsaron esta modificación fueron principalmente dos. En primer lugar, que la ecuación empleada hasta el momento describía un crecimiento exponencial. Sin embargo, este tipo de crecimiento no corresponde a la realidad, ya que supone una concentración ilimitada de recursos y, salvo a nivel industrial, este caso

de abundancia indefinida nunca se da. Y por otro lado, al tener los nutrientes como factor limitante es necesario que, dependiendo de la concentración de los mismos en el medio, condicionen el crecimiento del individuo.

El modelo de Monod, ampliamente utilizado en estudios de ecología y dinámica de poblaciones, se ajusta perfectamente a la restricción que se desea imponer, ya que permite describir como la limitación de nutrientes afecta a la tasa de crecimiento. Además, desde el punto de vista de un IbM es interesante aplicar modelos basados en comportamientos poblacionales, para analizar como a raíz de muchos comportamientos individuales emerge un comportamiento colectivo y, comprobar si somos capaces de reflejarlo con una herramienta de simulación.

Con respecto a la nueva ecuación empleada para obtener la biomasa que un organismo debe crecer, son pocos los parámetros modificables. Por un lado, está el parámetro μ_{max} , que se mantiene constante y es propio de cada cepa. En el caso de los experimentos realizados en PLASWIRES, la cepa de E.coli empleada generará una nueva división cada 20 minutos, que da lugar a un aumento de volumen máximo correspondiente a 0.036 fL (Femtolitos) al minuto. Además, desde *gro* estipulamos, tanto el tamaño mínimo que tiene una bacteria nada más dividirse como el máximo al que se produce una nueva división, correspondientes a 1.57 fL y el 3.14 fL. De esta forma, se produce una nueva división cuando se duplica el tamaño mínimo, adquiriendo volumen a la tasa máxima especificada para la cepa empleada (0.036).

Por otro lado, los parámetros modificables son el valor de K_s y la concentración de nutrientes disponible en la celda. En lo que respecta a la concentración, se modifica automáticamente en cada dt como resultado de la llamada a la función `csStep` implementada en el submódulo de consumo de nutrientes, `nutrient.c`. Por esta razón, el único parámetro del que se puede realizar un análisis es del valor de K_s .

El valor de K_s , es un parámetro puramente experimental, que permite definir para qué valor de la concentración disponible de nutrientes corresponde la tasa media de crecimiento, punto en el que tiene lugar la inflexión de la curva que describe el crecimiento. Si el valor de K_s es muy bajo, la tasa de crecimiento se aproximará al valor de μ_{max} y el punto de inflexión será muy acentuado, dando lugar a una caída muy brusca en la curva de crecimiento respecto al alimento de la celda. En cambio, si su valor es alto, la tasa de crecimiento tendrá un valor alejado del valor máximo establecido en μ_{max} , pero la curva será mucho más suave que en el caso anterior.

Para analizar que el crecimiento, tras la implementación en *gro*, realmente sigue el comportamiento descrito por la ecuación de Monod, se han realizado varias simulaciones en las que se ha creado una malla con una única celda suficientemente grande para que una bacteria y las generadas por la división de la primera no se salgan de la misma. Además, se ha establecido una concentración máxima de nutrientes correspondiente a 200 moléculas. La diferencia presente en todas ellas ha sido la

alteración del valor de K_s , con el objetivo de comprobar como afecta este parámetro a la curva y ver si corresponde a una curva de Monod.

En el caso de la simulación con un valor de K_s suficientemente pequeño (Fig. 7.1), se observa el comportamiento esperado. Como se puede apreciar, la tasa se mantiene próxima al valor máximo durante la mayor parte del tiempo, mientras que justo en el punto establecido se observa el punto de inflexión y la consiguiente caída drástica.

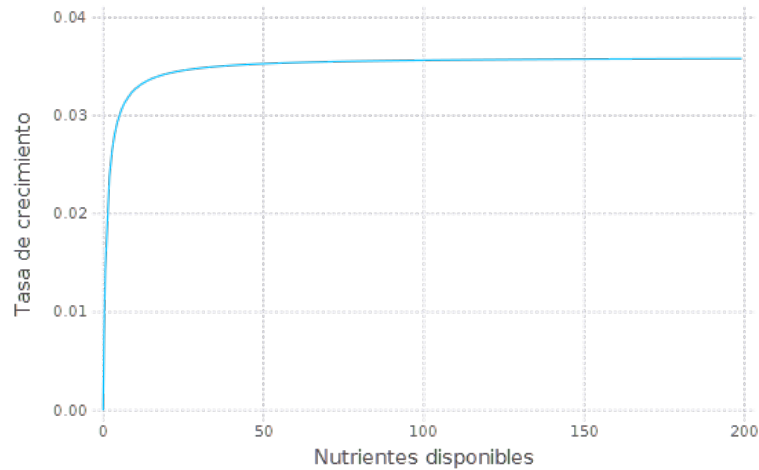


Figura 7.1.: Curva para un valor de K_s bajo. $K_s = \text{tasa de adquisición} = 1.5$

Por el contrario, si establecemos un valor considerablemente alto (Fig. 7.2), la tasa de crecimiento se alejará del valor máximo posible provocando un decrecimiento de la curva muy suavizado.

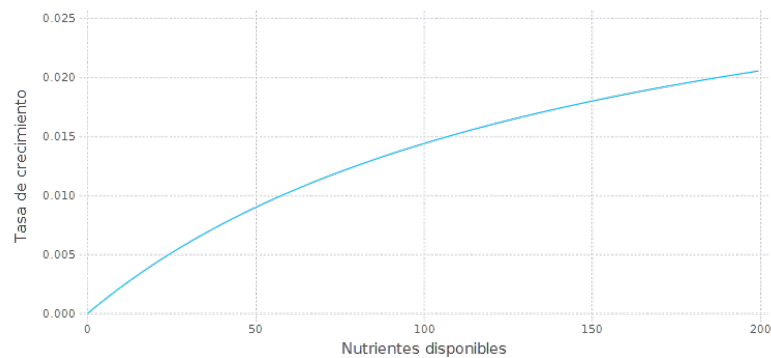


Figura 7.2.: Curva para un valor de K_s alto. Valor $K_s = 150$

Como consecuencia, se puede apreciar que cuanto más grande sea el valor de K_s , más progresivo y lento será el crecimiento, alejándonos de la tasa máxima posible.

Esta aceleración o reducción en el valor de K_s afectará al grosor del anillo de la colonia. Cuanto más bajo sea, más grueso será, mientras que si tiene un valor alto será menos grueso (Fig. 7.3). Recordemos, que el anillo era producido porque las bacterias del centro agotan todos los nutrientes antes debido a que llevan más tiempo presentes, mientras que las que conforman el perímetro son producto de nuevas divisiones y con motivo de la expansión de la colonia tienen acceso a nuevas zonas con alimento. Por este motivo, se forma un anillo constituido únicamente por las que siguen creciendo.

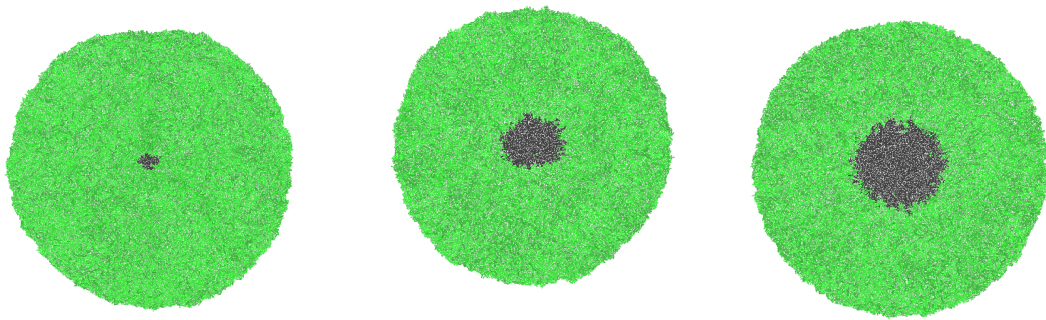


Figura 7.3.: Comparación del grosor del anillo según el valor de K_s (bajo, medio y alto)

7.1.2. Parámetros del módulo de consumo de nutrientes

Únicamente, en el momento de creación de la malla de nutrientes, todos los parámetros empleados para definir el entorno son establecidos. Mientras que algunos de ellos, aunque se podrían modificar, no aportan gran diferencia en los resultados obtenidos, hay otros en los que pequeños cambios suponen una gran diferencia.

Los parámetros modificables en el momento de creación de la malla, son los siguientes:

- Concentración máxima de nutrientes
- Tasa de adquisición
- Variabilidad
- Número de celdas
- Tamaño de cada celda
- Modo de asignación de concentración

A continuación, se describirá cada uno de ellos y se presentará la influencia que ejercen sobre los resultados obtenidos en las simulaciones.

7.1.2.1. Concentración máxima de nutrientes

El parámetro de concentración máxima de nutrientes especifica la cantidad efectiva de moléculas, tanto de alimento como de oxígeno, que pueden asignarse a cada celda. Ambos compuestos son necesarios para el crecimiento de la colonia [9]. Sin embargo, en lugar de separarlos como datos diferentes se ha decidido incluir el oxígeno dentro del conjunto formado por los nutrientes, debido a que ambos son condicionantes del crecimiento y se agotan por la misma razón, debido al avance de la colonia y la acumulación de desechos en el interior de la misma. Por ello, de aquí en adelante, cuando se hable de una reducción en la cantidad de nutrientes también se está haciendo referencia a la reducción de oxígeno.

Como ya se comentará en la Sección 7.1.2.4 la asignación de nutrientes dependerá del modo escogido, no siendo esta cantidad máxima siempre la que se asigne a cada nueva celda de la malla.

La influencia que ejerce este parámetro sobre los resultados en la simulación se refleja principalmente en la forma de la colonia. Bajo una situación de abundancia las bacterias conservarán su característica forma redondeada, mientras que ante la situación de escasez, el perímetro de la colonia se vuelve irregular. El grado de irregularidad del perímetro de la colonia, se acentuará cuanto menor sea la cantidad de nutrientes. El por qué de la generación de dichas irregularidades es debido a la competitividad de los individuos por adquirir los nutrientes.

A lo largo de las simulaciones realizadas, este parámetro se ha ido modificando para analizar diferentes sucesos relacionados, como se comentaba, con la obtención de formas irregulares, muy interesantes de analizar.

7.1.2.2. Tasa de adquisición y variabilidad de la misma

El parámetro de tasa de adquisición indica la cantidad máxima que una bacteria debe consumir por dt . Esta tasa está sometida a una variabilidad, con el objetivo de introducir al consumo el factor ruido presente en la naturaleza. De esta forma, aunque la tasa indique la cota máxima a consumir, no siempre se consumirá lo mismo.

El valor de la variabilidad es modificable, pero a lo largo de todas las simulaciones realizadas se ha mantenido su valor en 20 %, ruido considerado adecuado tras varias pruebas con diferentes valores. El consumo estará confinado a un valor entre la tasa actual de consumo y el valor de dicha tasa menos la variabilidad, siendo el valor

final escogido aleatoriamente entre esos dos valores.

En lo que respecta al valor de la tasa, se define desde *gro* en función del número de generaciones que se desee que dure el alimento aproximadamente. *gro* completa un ciclo de cálculo cada 0.1 minutos y el tiempo de generación de una nueva división está establecido también desde *gro* dura 20 minutos, por lo que el número de iteraciones necesarias para que se de una división es 200. De esta forma, si se desea que el alimento dure aproximadamente para N generaciones, únicamente hay que dividir la concentración total de nutrientes entre el número de iteraciones para N generaciones.

En los experimentos realizados, el valor de la tasa se calcula para los casos de 6, 9 y 12 generaciones. La modificación en la tasa influyen en el grosor del anillo externo que se forma debido al crecimiento de la colonia (Fig. 7.4).

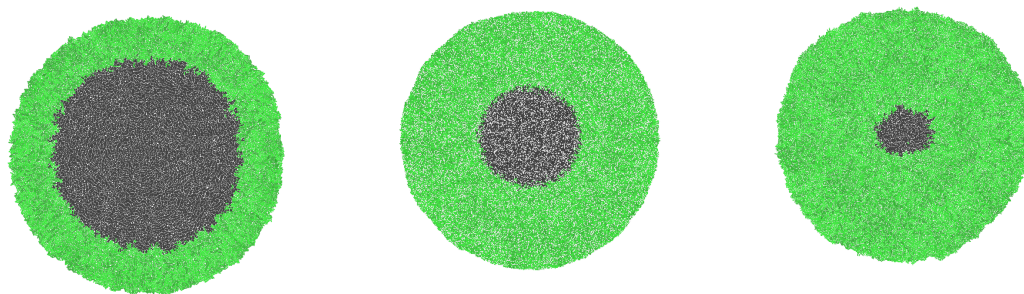


Figura 7.4.: Comparación del grosor del anillo (verde) para 6, 9 y 12 generaciones.
Nutrientes totales por celda = 200 moléculas
Tasas = 0.16 moléculas/ dt , 0.11 moléculas/ dt y 0.08 moléculas/ dt
La zona no coloreada corresponde a la densidad de población que no está creciendo.

Como se aprecia en la imagen, cuantas menos generaciones queremos que dure el alimento, más fino es el grosor del anillo. Esta diferencia en grosor se debe principalmente a que para que el alimento soporte la generación de un número pequeño de divisiones la tasa de adquisición es mayor, mientras que si queremos que soporte más divisiones, la tasa de adquisición será muy inferior.

7.1.2.3. Número de celdas y tamaño de cada una

Estos dos parámetros permiten especificar las dimensiones de la malla en el momento de la creación. Normalmente, la malla se suele crear con las mismas dimensiones que la malla de CellEngine [12], correspondiente a 10 celdas en cada dirección de ella.

Durante la simulación, la malla se irá ampliando a medida que sea necesario en función de las coordenadas de las bacterias recibidas.

El tamaño de la celda en el motor físico corresponde al tamaño medio que alcanza una bacteria antes de dividirse (Fig. 7.5). Sin embargo, en Cellsignal, podemos asignar diferentes tamaños con el objetivo de obtener una granularidad mayor y conseguir una distribución de los nutrientes más realista.

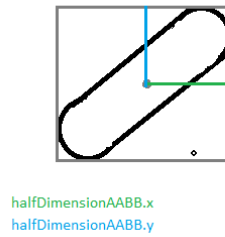


Figura 7.5.: Tamaño de cada celda en el motor físico [12]

La modificación en el número de celdas no supone ninguna alteración sobre el resultado final, debido a que cuando se necesite ampliar el tamaño de la malla se va a hacer. En cambio, el tamaño de cada celda, sí es un parámetro influyente. Su modificación produce una ampliación en el número de celdas posicionadas bajo una bacteria, debido a que si el tamaño definido en el motor corresponde al tamaño de una bacteria y en Cellsignal tenemos un tamaño inferior, el número de celdas de las cuales la bacteria puede consumir se incrementa.

Cuando sobre un experimento definimos la granularidad deseada, lo hacemos respecto a las celdas de CellEngine, que tienen un tamaño cuadrado correspondiente al tamaño final medio de una bacteria. Es decir, las celdas del motor corresponden a una medida de granularidad 1, mientras que si establecemos, por ejemplo, granularidad con un valor de 10 estamos haciendo referencia a que cada celda del motor corresponde a 100 en la malla de nutrientes, debido a que el tamaño de la celda es cuadrado y habrá 10 celdas pequeñas a cada lado.

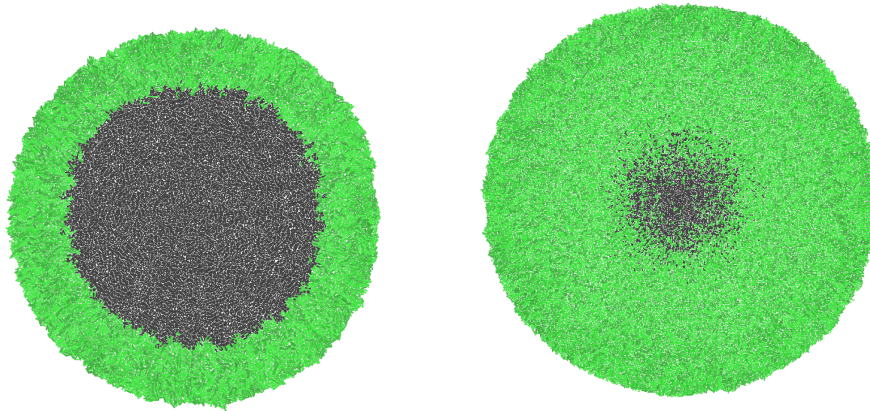


Figura 7.6.: Comparación del grosor con granularidad 1 y 10, respectivamente

El resultado al incrementar la granularidad provoca que la formación del anillo no sea tan brusca. La cantidad de nutrientes será la misma manteniendo el mismo patrón de distribución, pero dividida entre todas las celdas pequeñas especificadas por la granularidad con la que se haya decidido dividir cada celda equivalente a la del motor. De esta forma, como se mencionó previamente (Cap. 5), al ser la elección entre todas las celdas bajo una bacteria aleatoria, en vez de consumir siempre de la misma celda, se hace sobre varias dando lugar a un agotamiento más progresivo e influyendo en el grosor del anillo (Fig. 7.6).

7.1.2.4. Modo de asignación de concentración

La elección de un modo u otro, afecta a la forma en la que se distribuirá la cantidad máxima de nutrientes a lo largo de todas las celdas que conforman la malla.

Si la elección, es el modo **HOMOGENEOUS**, la distribución de los nutrientes se hará de forma homogénea hasta sobrepasar la distancia impuesta por el valor del radio máximo, momento a partir del cual el valor de los nutrientes será cero. En cambio, si se escoge el modo **GRADIENT**, la cantidad máxima de nutrientes que una celda puede tener dependerá de la distancia al centro de la malla.

Cada modo tiene aplicaciones diferentes, permitiendo estudiar diferentes situaciones presentes en la literatura. Mientras que el primero, contribuye a simular una placa de Petri en la que los nutrientes (limitados) se distribuyen de forma homogénea, el segundo, permite analizar situaciones en las que la comida se posiciona en un punto central pero cuanto más lejos esté la bacteria más complicado le será obtener alimento.

La influencia que ejerce cada uno de estos parámetros afecta fundamentalmente a la forma final de la colonia. Si la distribución es homogénea y más allá del radio no

hay alimento, la colonia permanecerá redondeada y se observará como poco a poco se van gastando los nutrientes, provocando una reducción en el grosor anillo. En caso contrario, a medida que la colonia crece, el alimento se va gastando provocando la aparición de formas irregulares en el perímetro de la colonia.

El efecto producido por estos dos modos, se observará en los experimentos expuestos a lo largo de este capítulo.

7.2. Obtención de la fase estacionaria

Hasta el momento se han descrito los parámetros que influyen en los resultados y de qué modo lo hacen. Pero, como se mencionaba al principio del capítulo, uno de los objetivos era la obtención de un crecimiento más realista, reflejado por la transición a la fase estacionaria. Dicha fase estacionaria, es obtenida cuando el ratio entre el número de bacterias que están creciendo y las que no, tiende a cero. Pero, para llegar a esta fase, es necesaria alguna restricción.

A medida que la colonia incrementa su tamaño es capaz de llegar a nuevas zonas con más recursos necesarios para su desarrollo. Sin embargo, las bacterias situadas en el interior de la colonia no tienen acceso a nuevas zonas quedando confinadas en el interior. Este encierro produce que se agoten los nutrientes y otros factores imprescindibles como es el oxígeno. De esta forma, las bacterias situadas en el interior pararán su crecimiento permitiendo alcanzar la fase estacionaria mediante una estabilización entre las que crecen y las que no. Con la realización de este trabajo, se propone la obtención de la fase estacionaria mediante el estudio de la influencia que ejerce la falta de nutrientes y oxígeno sobre el comportamiento de la colonia.

Para la validación de las curvas de crecimiento obtenidas en las distintas simulaciones ejecutadas, se han empleado los experimentos propuestos por Fujikawa y Morozumi [15]. En el paper reseñado, explican como las curvas de crecimiento de una colonia en un entorno con nutrientes limitados siguen una curva sigmoideal. Además, tras los experimentos realizados, extraen valiosas observaciones que se han querido probar en las distintas simulaciones. En primer lugar, observaron que las curvas de crecimiento para colonias con distinto tamaño inicial pero cultivadas bajo las mismas condiciones, convergen siempre aproximadamente al mismo tamaño final. Y en segundo lugar, que el crecimiento en colonias del mismo tamaño inicial pero con condiciones de cultivo diferentes, da lugar a diferentes tamaños finales.

Las condiciones en las que se realizaron sus experimentos sobre E.coli consistían en una placa sobre la cual se deposita una membrana, la cual se ira retirando para hacer el conteo de bacterias en crecimiento. Por este motivo, en todas las simulaciones relacionadas con la validación de los datos experimentales propuestos [15], se ha empleado en modo de simulacion HOMOGENEOUS.

A continuación se mostrarán las simulaciones realizadas, en las que el objetivo era comprobar que se obtenían los mismos resultados que en los datos experimentales presentados en [15].

7.2.1. Curva sigmoideal

La curva de crecimiento obtenida en *gro* hasta el momento, permanecía indefinidamente en fase exponencial (Fig. 7.7, arriba). Para provocar la transición, de esta fase a la fase estacionaria (Fig. 7.7, abajo), era necesario la introducción de una restricción en el medio que provocase que las bacterias dejaran de crecer. La restricción introducida ha sido la limitación de nutrientes.

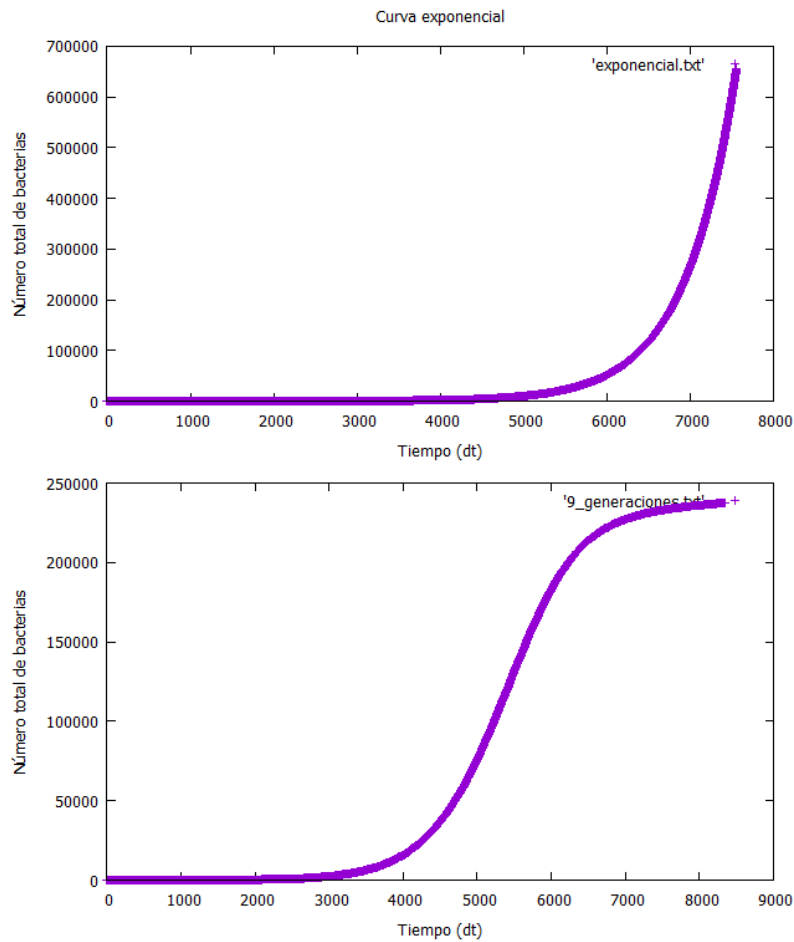


Figura 7.7.: Curva de crecimiento antes y después de la implementación del consumo de nutrientes

En la imagen de la arriba, se puede observar como era la curva de crecimiento previamente a la introducción de la restricción de alimento. Y en la imagen de abajo

se observa la curva de crecimiento actual. Como se puede constatar, el objetivo de llegar a fase estacionaria se ha cumplido introduciendo únicamente en el medio la restricción de nutrientes.

Ambas imágenes se han obtenido como resultado de dos simulaciones bajo las mismas condiciones y en una malla con granularidad 1:

- Número de bacterias iniciales = 1
- Concentración máxima de nutrientes = 200 moléculas
- Tasa de adquisición = 0.11 (9 generaciones) moléculas/ dt
- Variabilidad = 0.2
- Modo de asignación de concentración = HOMOGENEOUS

7.2.2. Convergencia al mismo tamaño final

Basándonos en los datos experimentales de Fujikawa y Morozumi, en las curvas de crecimiento obtenidas en experimentos con colonias que están sujetas a las mismas condiciones de cultivo (misma temperatura, nutrientes, etc...), el tamaño final siempre converge aproximadamente al mismo valor (Fig. 7.8).

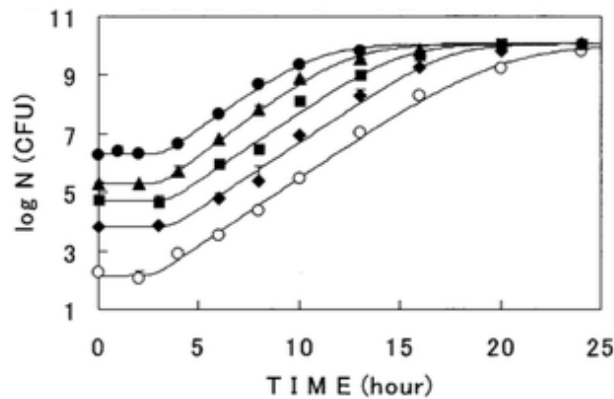


Figura 7.8.: Convergencia al mismo tamaño final [15]

Sin embargo, tanto el número de bacterias inicial y final obtenido, como la cantidad de tiempo en horas presentes en sus experimentos, no es posible obtenerlos con los simuladores de hoy en día. Por este motivo, se ha procurado adaptar lo mejor posible sus experimentos con los valores que si podemos representar en las simulaciones.

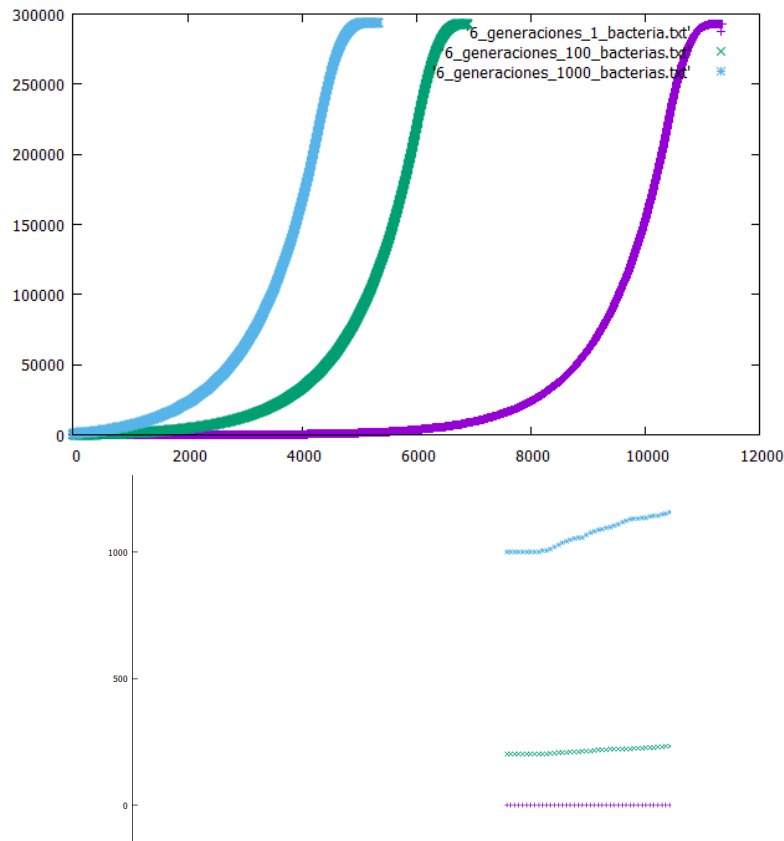


Figura 7.9.: Convergencia al mismo tamaño final [15]

Los diferentes valores empleados en las simulaciones mostradas en las imágenes anteriores son:

- Número de bacterias iniciales = 1, 100 y 1000
- Concentración máxima de nutrientes = 200 moléculas
- Tasa de adquisición = 0.16 (6 generaciones) moléculas/ dt
- Variabilidad = 0.2
- Modo de asignación de concentración = HOMOGENEUOS

Como se puede observar, las tres simulaciones parten de distintos tamaños iniciales, pero sin embargo, convergen al mismo valor final. Se puede apreciar una desviación en el tiempo en el que se ha alcanzado la fase estacionaria, como consecuencia de que las colonias que comienzan con un mayor número de individuos, evidentemente, comienzan en el minuto cero de la simulación con esta ventaja. Sin embargo, como se esperaba, se ha llegado al mismo valor final en las tres, ya que independientemente

del número de bacterias con las que se comience, si las condiciones son las mismas la tasa de crecimiento permanece igual en todas las simulaciones.

7.2.3. Convergencia a distintos tamaños finales

El otro resultado obtenido experimentalmente por Fujikawa y Morozumi, establece que las curvas de crecimiento para colonias que presenten el mismo tamaño inicial, pero las condiciones de cultivo sean diferentes, convergerán a distintos tamaños finales (Fig. 7.10).

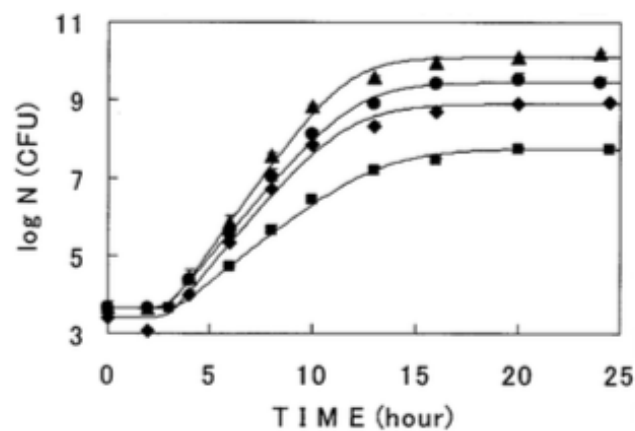


Figura 7.10.: Convergencia a distintos tamaños finales [15]

Al igual que ocurría en la Sección 7.2.2, debido a limitaciones computacionales no ha sido posible probar los experimentos propuestos con los mismos valores, siendo necesario ajustarlos a valores posibles de simular.

Los diferentes valores empleados en las simulaciones mostradas en las imágenes anteriores son:

- Número de bacterias iniciales = 1
- Concentración máxima de nutrientes = 200
- Tasa de adquisición = 0.16 moléculas/ dt (6 generaciones), 0.11 moléculas/ dt (9 generaciones) y 0.08 moléculas/ dt (12 generaciones)
- Variabilidad = 0.2
- Modo de asignación de concentración = HOMOGENEOUS

Como se puede observar, el resultado de tener condiciones diferentes da lugar a un crecimiento mayor en aquellas simulaciones en las que el alimento dura un mayor número de generaciones (Fig. 7.11). En cambio, ahora no hay presente ningún desfase temporal, debido a que se comienza con el mismo número de bacterias en los tres casos.

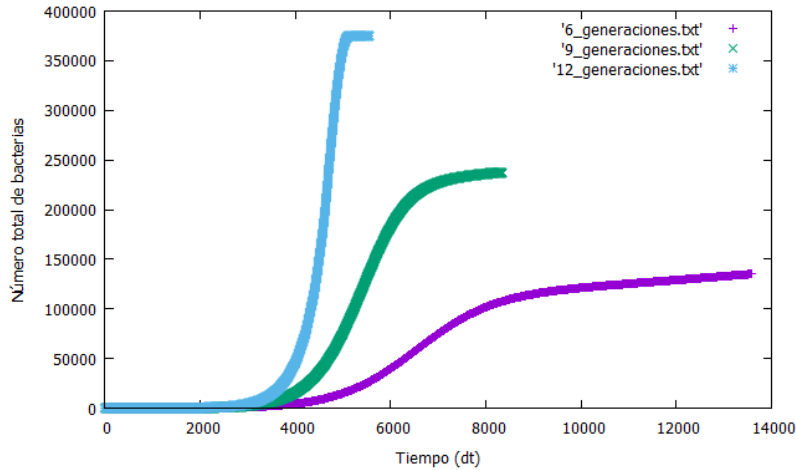


Figura 7.11.: Curvas de crecimiento obtenidas con distintas tasa de adquisición

7.3. Difusión de los nutrientes

En la naturaleza, generalmente en medios de cultivo líquidos, existe un movimiento continuado de los nutrientes mediante un proceso de difusión. De esta forma las bacterias pueden consumir alimento situado más allá del punto exacto de la superficie dónde se están ubicadas.

En las simulaciones presentadas en las secciones anteriores, el consumo de nutrientes se realiza de forma egoísta. Con la aplicación del término egoísta, realmente se está haciendo referencia a que el tamaño de cada celda en CellEngine [12] corresponde a las dimensiones de una bacteria. De este modo, aunque los empujones producidos por el movimiento fruto del crecimiento pueden dar lugar a que haya partes de diferentes bacterias en una misma celda, lo más habitual es que la bacteria consuma únicamente de una celda. Por este motivo se ha decidido plantear un posible mecanismo de difusión de los nutrientes presentes en la malla de CellSignal.

Una referencia muy útil para plantear como abordar el problema de la difusión desde el punto de vista de la malla de nutrientes implementada, ha sido la propuesta en [16]. En [16] también disponen de una malla, pero en la cual los individuos están fijos y en el momento de consumir simulan el proceso de difusión, instando a los individuos a que en caso de no disponer de nutrientes en su celdas, consulten y consuman de sus celdas vecinas a una determinada distancia. El valor de la distancia determina

a cuantas celdas vecinas como máximo se puede consultar y posteriormente consumir. Por ejemplo, en el caso de una distancia máxima de 2, los individuos podrán consultar primero sus celdas adyacentes situadas a distancia 1. En caso de no poder consumir, normalmente por falta de nutrientes a distancia 1, consultarán y consumirán (si pueden) de las celdas situadas dos posiciones más allá de la celda en la que el individuo está ubicado, es decir, a distancia 2.

La propuesta realizada en este trabajo para analizar el proceso de difusión de nutrientes, consiste en ampliar el tamaño de la celda de forma que podamos simular el “acceso” a regiones situadas más allá de la posición de la bacteria. En esta aproximación, en lugar de ser los nutrientes lo que se acercan por difusión a los individuos, son éstos lo que se acercan a las regiones con más comida situadas a una determinada distancia. Además, al aumentar el tamaño de cada celda entrará un mayor número de bacterias completamente en cada una, lo que dará lugar a un comportamiento en el que se incita a la competitividad por los nutrientes.

Independientemente de que se amplíe el tamaño de la celda, la idea es mantener los datos de las simulaciones igual que en el caso del tamaño normal de la celda, correspondiente al tamaño de una bacteria. De esta forma, varias bacterias en la misma región de espacio compartirán alimento dando lugar a resultados en los que se refleja un comportamiento competitivo una vez agotado el alimento que tendrían en su propia celda.

El resultado de modificar el tamaño de la celda y favorecer la competitividad, como se verá a continuación, dará lugar cambios en la morfología de la colonia, llegando a perder su habitual forma redondeada y dando lugar a ramificaciones resultado de la búsqueda de alimento por parte de las bacterias. El cambio en la morfología será más evidente en situaciones de escasez de nutrientes [17].

7.3.1. Difusión a distancia 1

A continuación se presentan los resultados de las simulaciones en las que se ha incorporado un proceso de difusión a distancia 1. Para ello, se ha ampliado el tamaño de cada celda al doble (Fig. 7.12), de forma que entrarían aproximadamente cuatro bacterias en su interior debido a que el tamaño de cada una es cuadrado.

La cantidad total de nutrientes se aumenta conforme aumenta el tamaño, por lo que a esta distancia habría que cuadruplicar la cantidad que se deseara poner en una celda. Sin embargo, la tasa de adquisición no se recalcula, manteniéndola conforme a la cantidad deseada de nutrientes en una celda. Esto se debe a que el hecho que se desea analizar, es el comportamiento en un entorno competitivo en el que hay varios individuos en la misma región del espacio pero en el que siguen consumiendo lo mismo.

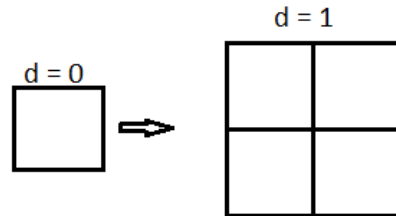


Figura 7.12.: Equivalencia entre celdas a distancia = 1

En primer lugar, se han realizado tres experimentos en los que se ha mantenido la misma concentración de nutrientes iniciales para cada una de las subceldas que constituiría la celda ampliada. Cada una de las simulaciones se ha realizado atendiendo a las distintas tasas vistas en casos anteriores correspondientes a 6 (Fig. 7.13), 9 (Fig. 7.14) y 12 generaciones (Fig. 7.15). El número de bacterias inicial ha sido una en todos los casos y el modo de simulación ha sido HOMOGENEOUS, con el objetivo de establecer una comparación con las simulaciones vistas bajo las mismas condiciones.

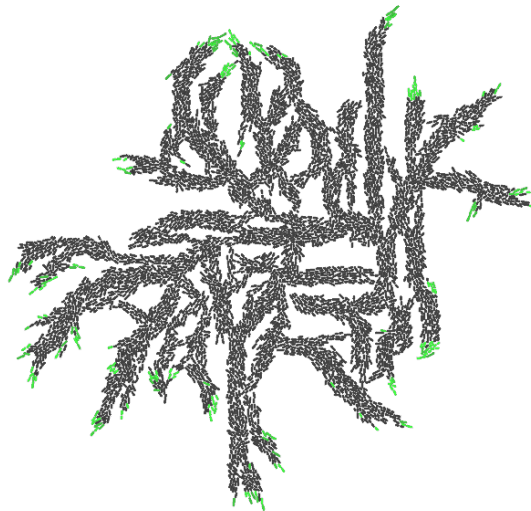


Figura 7.13.: Simulación correspondiente a 6 generaciones a distancia = 1.
 Nutrientes totales = $200 \cdot 4 = 800$ moléculas
 Tasa de adquisición = 0.16 moléculas/ dt

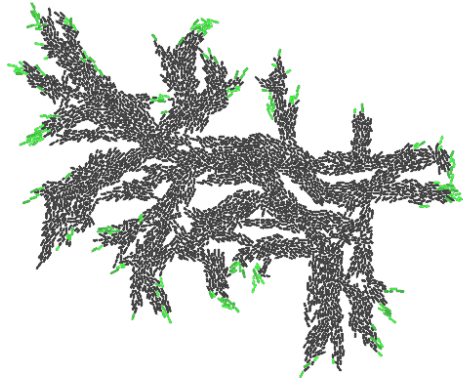


Figura 7.14.: Simulacion correspondiente a 9 generaciones a distancia = 1.
 Nutrientes totales = $200 \cdot 4 = 800$ moléculas
 Tasa de adquisición = 0.11 moléculas/ dt

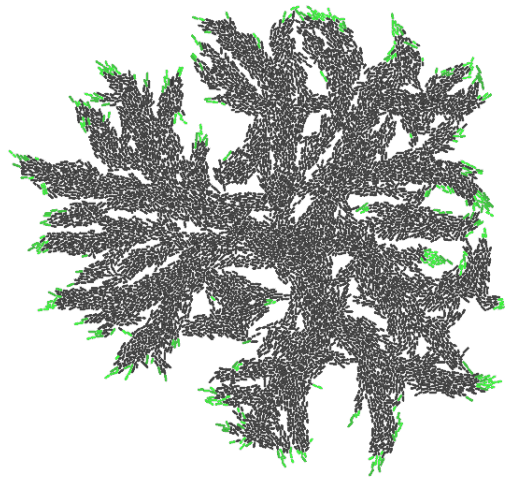


Figura 7.15.: Simulacion correspondiente a 12 generaciones a distancia = 1.
 Nutrientes totales = $200 \cdot 4 = 800$ moléculas
 Tasa de adquisición = 0.08 moléculas/ dt

Como se puede observar, la morfología de la colonia es ramificada como fruto de la escasez de nutrientes acentuada por la competitividad entre bacterias dentro de una misma celda. A medida que se desea obtener un mayor número de generaciones y por tanto se reduce la tasa de consumo, las ramificaciones se tornan más gruesas. Este hecho indica que ha habido un mayor crecimiento, notándose cada vez menos la carencia de nutrientes.

Debido a la situación de escasez vista, se ha decidido duplicar la concentración de

nutrientes totales para cada una de las subceldas. De esta forma, la concentración pasaría de ser en cada celda individual de 200 a 400. Las tasas de consumo se han recalculado conforme a este nuevo valor. El resto de parámetros se han mantenido igual.

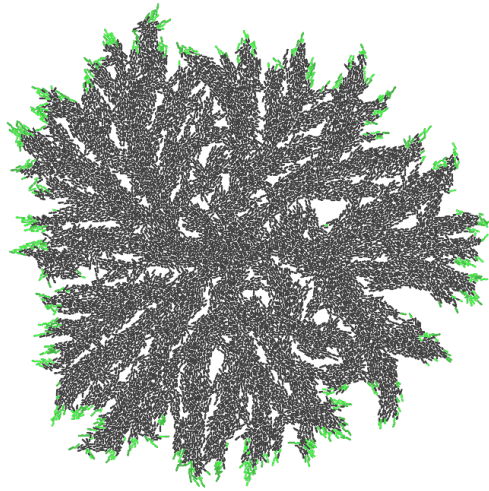


Figura 7.16.: Simulación correspondiente a 6 generaciones a distancia = 1.
Nutrientes totales = $400 \times 4 = 1600$ moléculas
Tasa de adquisición = 0.33 moléculas/ dt

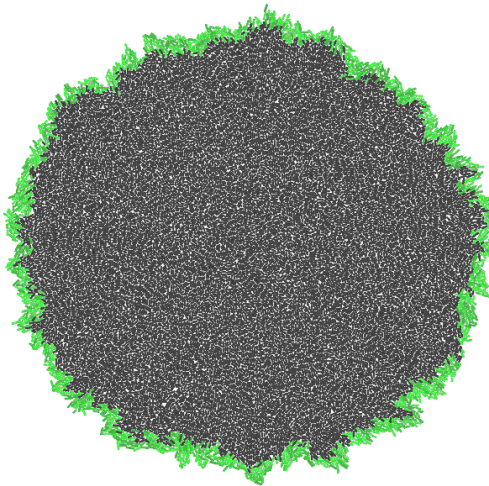


Figura 7.17.: Simulación correspondiente a 9 generaciones a distancia = 1.
Nutrientes totales = $400 \times 4 = 1600$ moléculas
Tasa de adquisición = 0.22 moléculas/ dt

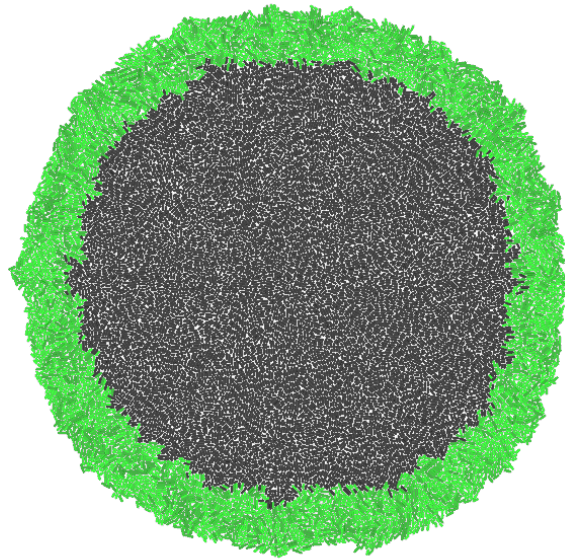


Figura 7.18.: Simulación correspondiente a 12 generaciones a distancia = 1.

Nutrientes totales = $400 \cdot 4 = 1600$ moléculas

Tasa de adquisición = 0.16 moléculas/ dt

Al duplicar la cantidad de nutrientes, se puede apreciar la ausencia de nutrientes en los dos últimos casos en lo que la tasa de consumición es menor. Además, para el caso correspondiente a 6 generaciones, aunque siguen apareciendo ramificaciones, el grosor de las mismas es considerablemente mayor.

Por lo tanto, de los resultados obtenidos a esta distancia, se puede concluir que ante una situación de carencia de nutrientes se producen ramificaciones. Y además, dichas ramificaciones se vuelven más gruesas cuanto menor es la tasa de consumición, factor por el cual se dan un mayor número de generaciones. Aún así, en los casos en los que la forma se ha mantenido redondeada, producto de la competitividad, se observa que el anillo es considerablemente más estrecho que en los casos vistos en secciones anteriores con una menor cantidad de nutrientes, pero ante una situación de no compartición de recursos.

7.3.2. Difusión a distancia 2

En este caso, para simular la posibilidad de consumir de celdas situadas a dos posiciones de la celda en la que se encuentra la bacteria, es necesario multiplicar por tres el tamaño de la celda a cada uno de sus lados. Por lo tanto, en vez de tener una celda equivalente a cuatro celdas tal y como están representadas en el motor, habrá nueve (Fig. 7.19).

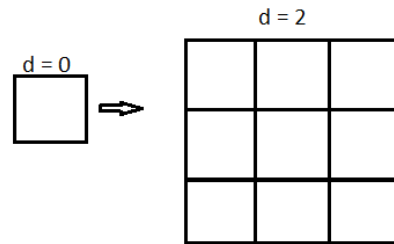


Figura 7.19.: Equivalencia entre celdas a distancia = 2

Al igual que en la sección anterior, en primer lugar se mostrarán los resultados aplicando esta distancia para un valor de celda igual a 200, y posteriormente para el caso en el que la concentración de nutrientes es duplicada. Por este motivo, las tasas de adquisición y la cantidad total de nutrientes resultado de la suma de la cantidad deseada para cada una de las subceldas que formarían la celda ampliada.

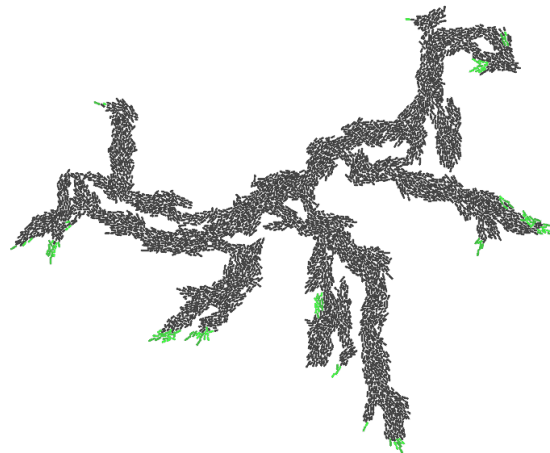


Figura 7.20.: Simulacion correspondiente a 6 generaciones a distancia = 2.
 Nutrientes totales = $200 \cdot 9 = 1800$ moléculas
 Tasa de adquisición = 0.16 moléculas/ dt

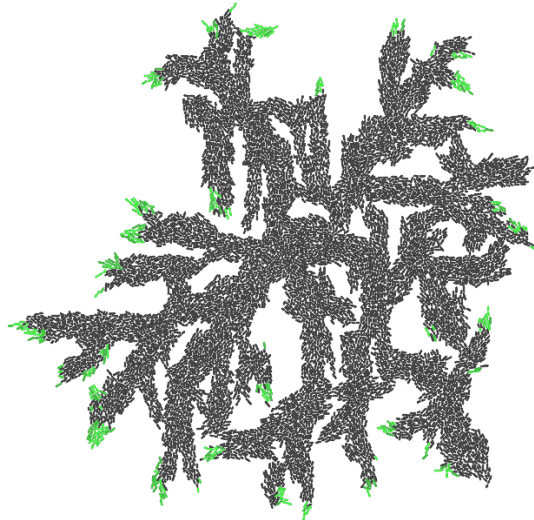


Figura 7.21.: Simulacion correspondiente a 9 generaciones a distancia = 2.
 Nutrientes totales = $200 \cdot 9 = 1800$ moléculas
 Tasa de adquisición = 0.11 moléculas/ dt

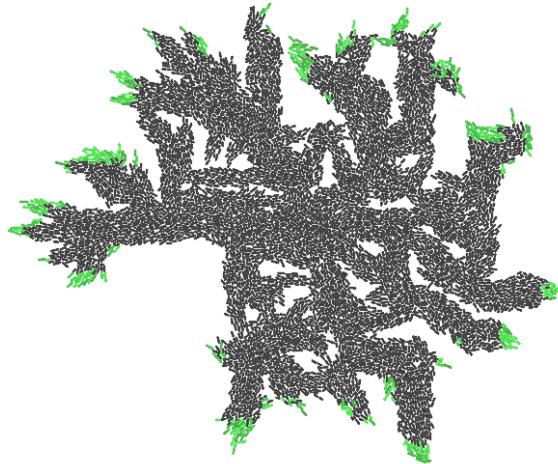


Figura 7.22.: Simulacion correspondiente a 12 generaciones a distancia = 2.
 Nutrientes totales = $200 \cdot 9 = 1800$ moléculas
 Tasa de adquisición = 0.08 moléculas/ dt

Si comparamos los resultados obtenidos para distancia 1 y 2 con estos mismos datos, se puede apreciar que siguen ocurriendo ramificaciones porque se mantiene una situación de carencia de nutrientes. En cambio, se nota que al aumentar la distancia, y por tanto incrementar la competitividad, el número de ramas se reduce, es decir, se obtienen menos individuos. Esto se debe a que los nutrientes se consumen más

rápido ya que hay un número mayor de bacterias en el interior de la celda ampliada, lo que resultará en que el alimento no dure todas las generaciones para las que estaba pensado. Sin embargo, el grosor de las ramas se mantiene igual.

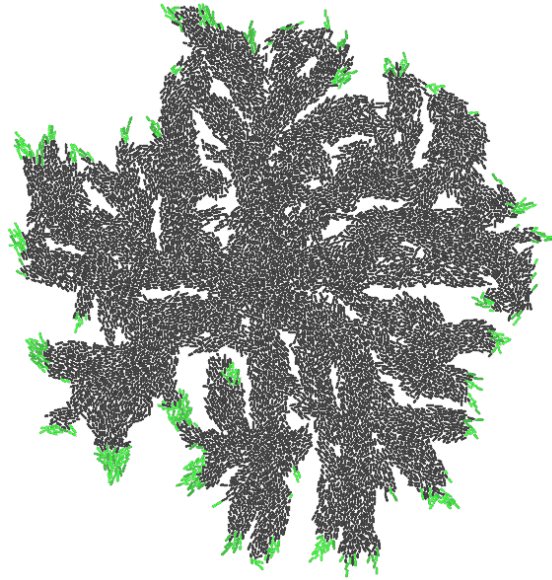


Figura 7.23.: Simulación correspondiente a 6 generaciones a distancia = 2.
Nutrientes totales = $400 \cdot 9 = 3600$ moléculas
Tasa de adquisición = 0.33 moléculas/ dt

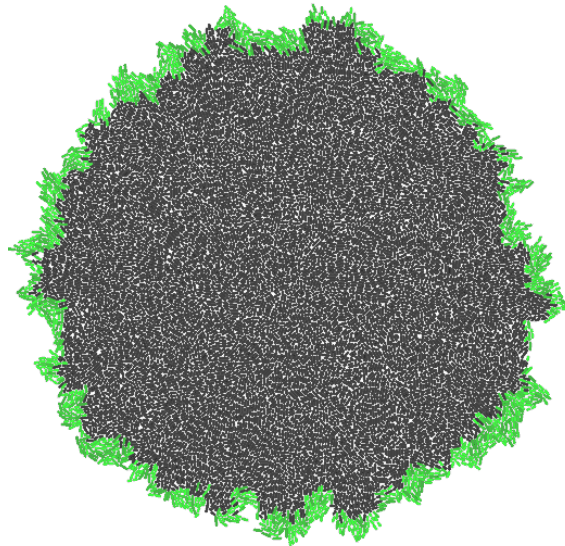


Figura 7.24.: Simulación correspondiente a 9 generaciones a distancia = 2.
Nutrientes totales = $400 \cdot 9 = 3600$ moléculas
Tasa de adquisición = 0.22 moléculas/ dt

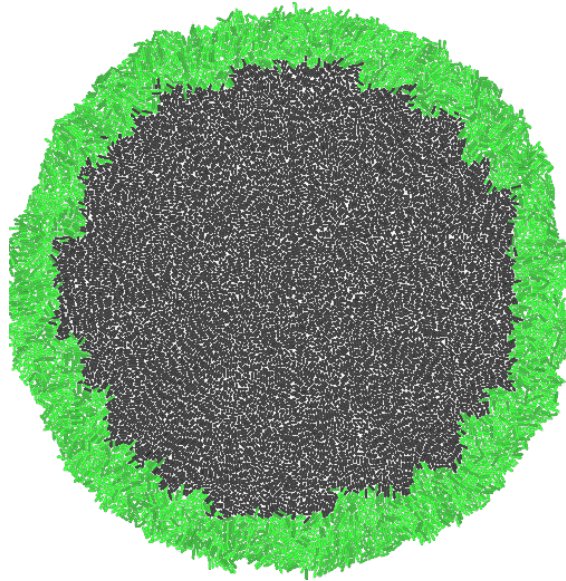


Figura 7.25.: Simulación correspondiente a 12 generaciones a distancia = 2.
 Nutrientes totales = $400 \cdot 9 = 3600$ moléculas
 Tasa de adquisición = 0.16 moléculas/ dt

Para este último caso, al igual que se hizo en la sección anterior, se ha aumentado la concentración de nutrientes. Los resultados desvelan que en el primer caso sigue habiendo ramificaciones, pero al igual que se comentaba en el caso anterior su grosor se mantiene igual y hay un menor número de ellas. Para los casos de 9 y 12 generaciones, al igual que ocurría a distancia 1, la forma se mantiene redondeada. En el caso de las formas redondeadas el grosor del anillo para ambas distancias es también es igual.

7.3.3. Difusión con reducción de nutrientes

Las pruebas de difusión a distintas distancias analizadas en las secciones anteriores, están situadas en un entorno en el que la distribución de los nutrientes se realiza de forma homogénea. Como se ha visto, a medida que se amplían los nutrientes y/o la tasa de adquisición, la morfología de las colonias es redondeada.

Las *E.coli* presentan diferentes patrones según la concentración de nutrientes presentes en el medio, así como la concentración de agar-agar [17]. En lo que respecta a los nutrientes, cuanto mayor sea su concentración más redondez presentará la forma final de la colonia, mientras que antes situaciones de escasez se comenzarán a ver ramificaciones.

Lo que se pretende mostrar en esta sección es cómo afecta la reducción progresiva de nutrientes en entornos en lo que, además, hay competición por los recursos. Para ello,

se han empleado los datos correspondientes a la simulación con una concentración inicial de 400 y una tasa suficiente para 12 generaciones (0.16). Para representar la reducción se ha especificado en la creación que el modo de distribución de nutrientes es GRADIENT.

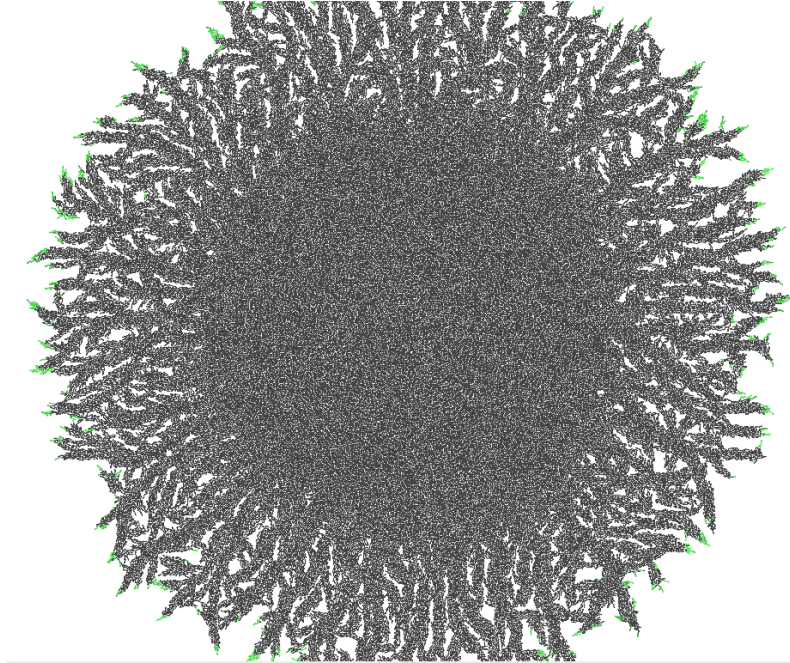


Figura 7.26.: Simulación con reducción de nutrientes

Como se observa en el resultado (Fig. 7.26), en las primeras fases del crecimiento, debido a que hay abundancia de nutrientes, la colonia crece de forma compacta y redondeada. En cambio, debido a la reducción de nutrientes, a medida que la colonia avanza y empieza a notar la escasez de nutrientes, la forma se torna irregular dando lugar a numerosas ramificaciones.

De esta forma, se puede concluir que la reducción de nutrientes afecta sustancialmente a la forma final de la colonia, generando ramificaciones que tienden a las zonas con nuevos nutrientes a medida que se van agotando.

Capítulo 8

Conclusiones

Como se mencionó al principio del documento, el trabajo realizado está ubicado dentro del campo de la biología sintética, en el que la utilización de simuladores es crucial. Dentro de PLASWIRES, proyecto europeo de biología sintética en el que se engloba este trabajo, el simulador empleado es GRO, gracias al cual es posible simular grandes colonias de bacterias y estudiar comportamientos colectivos que emergen de todos los comportamientos individuales.

El crecimiento observado para un conjunto de bacterias simuladas en GRO, sigue una curva exponencial, debido a la carencia de alguna restricción que frene el ritmo de crecimiento, de forma que todas las bacterias crecen por igual. Para paliar esta situación y obtener un crecimiento mucho más realista, en este trabajo se ha implementado un módulo que restringe la cantidad de nutrientes al que las bacterias tienen acceso, condicionando el crecimiento al pasar de un entorno de simulación con recursos ilimitados a uno con limitaciones. Dichos nutrientes, se representarán como un único valor tanto alimento como oxígeno, debido a que ambos son factores determinantes para el crecimiento y se reducen al mismo tiempo y bajo las mismas circunstancias.

En el módulo creado, CellSignal, se ha implementado una malla en dos dimensiones constituida por celdas a las cuales se les asignará una concentración de nutrientes. Dicha concentración puede distribuirse a lo largo de la malla según dos modalidades, o bien de forma homogénea poniendo la misma cantidad en todas las celdas, o bien reduciendo la cantidad dependiendo de la distancia a la que se encuentren las celdas al centro de la malla. Las funcionalidades implementadas en el módulo atañen tanto a la creación, destrucción y mantenimiento de la malla, como al consumo de los nutrientes presentes en la misma.

Como segunda aportación, se ha implementado en GRO la ecuación del crecimiento condicionado a una limitación de alimento. Para ello, se ha empleado la ecuación de Monod que permite relacionar la cantidad de nutrientes disponible con el incremento

en biomasa que una bacteria debe crecer.

Finalmente, se han mostrado los resultados obtenidos en las simulaciones realizadas y se ha comparado con datos experimentales que permitiesen validar el comportamiento observado. A lo largo de esta última parte se realiza un análisis de las distintas combinaciones de los parámetros influyentes, tanto en CellSignal como en la ecuación de crecimiento. Además, se han presentado situaciones en las que las bacterias compiten por los recursos obteniendo resultados muy interesantes de analizar.

En las simulaciones, se ha podido observar que la forma en la que se distribuyen los nutrientes en el espacio juega un papel determinante en el resultado. Ante una situación de abundancia, la forma de las colonias se mantiene regular y redondeada. En estas situaciones, fruto del crecimiento se genera un anillo en la periferia de la colonia constituido por aquellas bacterias que siguen creciendo debido a que son capaces de acceder a zonas con nuevo alimento, mientras que en el interior de la colonia se acumularán aquellas bacterias que han parado de crecer por falta de nutrientes y oxígeno. Dicho anillo se mantendrá constante hasta que deje de haber alimento, momento en el cual comenzará a reducirse hasta que se consuma por completo debido a la ausencia de recursos.

Otra apreciación que puede extraerse de las simulaciones, es que ante situaciones en las que se fuerza la competencia por los recursos, el perímetro de la colonia se torna irregular, generando ramificaciones de distinto grosor y envergadura. Estas ramificaciones, también son observadas en etapas finales del crecimiento de una colonia cuando la distribución del alimento no se hace de forma homogénea. En estos casos, a medida que el alimento se reduce progresivamente conforme avanza la colonia la forma redondeada presente en las primeras etapas de crecimiento comienza a ramificarse a medida que las bacterias se encuentran más alejadas de la zona en la que se estableció una mayor abundancia de nutrientes.

Capítulo 9

Trabajo futuro

En relación con el trabajo presentado es posible generar muchos hilos de trabajo futuro. Se ha mostrado la importancia que supone tener alguna restricción en el medio, obteniendo un crecimiento considerablemente más realista.

Una posible continuación sería el estudio, implementación y validación de otras restricciones que se sabe que influyen en el crecimiento de las colonias, como es el caso del pH. En base a esta idea, podrían añadirse dichas restricciones a la malla provocando una penalización sobre la cantidad de nutrientes que la bacteria es capaz de consumir.

También hay otros factores que no están relacionados con la consumición pero que si afectan al ritmo de crecimiento. Uno de estos factores, empleado en PLASWIREs, son los plásmidos. Los plásmidos son secuencias circulares de ADN extracromosómico que le confieren a las bacterias ventajas evolutivas frente al medio. Sin embargo, dichos plásmidos, al igual que ocurre con los nutrientes, deberían penalizar el crecimiento de la bacteria debido al coste metabólico que supone la tenencia del plásmido. Por esta razón, se considera la opción de añadir la penalización por tenencia de plásmidos a la fórmula de adquisición de volumen implementada siguiendo el modelo de Monod [14].

Una idea en la que ya se está trabajando, y se considera que en un futuro próximo saldrá adelante, consiste en conseguir modelar la fase de muerte después de que la colonia se mantenga un tiempo en fase estacionaria. Para ello, se está estudiando cual sería el tiempo más adecuado a partir del cual considerar a una determinada bacteria muerta, para así poder descartarla. Un vez que comenzasen a descartarse bacterias, y ante la ausencia de nutrientes y oxígeno, la curva de crecimiento comenzaría a decrecer como resultado de que el número de bacterias muertas superaría a las vivas.

Finalmente, se está valorando la opción de refinar el mecanismo de difusión y estudiar

en mayor detalle los comportamientos generados en entornos donde la difusión es el medio de transporte en el medio. En especial, se quiere hacer hincapié en un proceso conocido como **agregación limitada por difusión**. Este proceso describe un comportamiento en un entorno con difusión en el que las bacterias se aglomeran para formar agregados con formas fractales.

Anexo

Enlace a los vídeos generados en algunas simulaciones: <http://bit.ly/1LwPVUw>

Bibliografía

- [1] A. P.García, “A first approach to individual-based modelling of the bacterial conjugation dynamics,” 2011. 8
- [2] T. J. Rudge, P. J. Steiner, A. Phillips, and J. Haseloff, “Computational modeling of synthetic microbial biofilms,” *ACS Synthetic Biology*, vol. 1, no. 8, pp. 345–352, 2012. 8
- [3] Á. G. Moreno and M. Amos, “Discrete modelling of bacterial conjugation dynamics,” *CoRR*, vol. abs/1211.1146, 2012. 9
- [4] S. S. Jang, K. T. Oishi, R. G. Egbert, and E. Klavins, “Specification and simulation of synthetic multicelled behaviors,” *ACS Synthetic Biology*, vol. 1, no. 8, pp. 365–374, 2012. 9, 22, 24
- [5] “Chipmunk 2 physics library,” 2012. 10, 25
- [6] L. A. Lardon, B. V. Merkey, S. Martins, A. Dötsch, C. Picioreanu, J.-U. Kreft, and B. F. Smets, “idynomics: next-generation individual-based modelling of biofilms,” *Environmental Microbiology*, vol. 13, no. 9, pp. 2416–2434, 2011. 10
- [7] D. A. Lansing M.Prescott, John P.Harley, “Microbiología,” 2000. 12
- [8] J. Nazar C, “Biofilms bacterianos,” *Revista de otorrinolaringología y cirugía de la cabeza y cuello*, vol. 67, pp. 161 – 172, 04 2007. 17
- [9] A. Cooper, A. Dean, and C. Hinshelwood, “Factors affecting the growth of bacterial colonies on agar plates,” *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, vol. 171, no. 1023, pp. 175–199, 1968. 19, 44
- [10] P.-T. Su, C.-T. Liao, J.-R. Roan, S.-H. Wang, A. Chiou, and W.-J. Syu, “Bacterial colony from two-dimensional division to three-dimensional development,” *PLoS ONE*, vol. 7, 11 2012. 20
- [11] J. A. Cole, L. Kohler, J. Hedhli, and Z. Luthey-Schulten, “Spatially-resolved metabolic cooperativity within dense bacterial colonies,” *BMC systems biology*, vol. 9, no. 1, p. 15, 2015. 21

- [12] L. E. M. Martín, “Nuevo algoritmo de relajación para motores de cuerpos sólidos,” 2014. 22, 25, 45, 46, 53
- [13] E. Klavins and R. Murray, “Ieee pervasive comput.3, 56-65,” 2004. 23
- [14] J. Monod, “The growth of bacterial cultures,” *Selected Papers in Molecular Biology by Jacques Monod*, p. 139, 2012. 36, 40, 66
- [15] H. Fujikawa and S. Morozumi, “Modeling surface growth of escherichia coli on agar plates,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 12, pp. 7920–7926, 2005. 48, 49, 50, 51, 52
- [16] S. M. Krone, R. Lu, R. Fox, H. Suzuki, and E. M. Top, “Modelling the spatial dynamics of plasmid transfer and persistence,” *Microbiology*, vol. 153, no. 8, pp. 2803–2816, 2007. 53
- [17] R. Tokita, T. Katoh, Y. Maeda, J. ichi Wakita, M. Sano, T. Matsuyama, and M. Matsushita, “Pattern formation of bacterial colonies by escherichia coli,” *Journal of the Physical Society of Japan*, vol. 78, no. 7, p. 074005, 2009. 54, 62

Este documento esta firmado por



Firmante	CN=tfgm.fi.upm.es, OU=CCFI, O=Facultad de Informatica - UPM, C=ES
Fecha/Hora	Thu Jun 25 20:53:53 CEST 2015
Emisor del Certificado	EMAILADDRESS=camanager@fi.upm.es, CN=CA Facultad de Informatica, O=Facultad de Informatica - UPM, C=ES
Numero de Serie	630
Metodo	urn:adobe.com:Adobe.PPKLite:adbe.pkcs7.sha1 (Adobe Signature)